

N° d'ordre :

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
&
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DJILLALI LIABÈS
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE
LA VIE
SIDI-BEL-ABBÈS



Thèse DE DOCTORAT

Présentée par : Mr. NAIMI Mostefa

Spécialité : Microbiologie appliquée et moléculaire

Intitulé :

Guedid ; analyses physicochimiques et microbiologiques, identification phénétique et évaluation probiotique du microbiote lactique

Soutenue le : 14 Juin 2021

Devant le jury composé de :

Président : Mr. DIAF Mustapha., MCA, UDL Sidi-Bel-Abbès

Examineurs : Mme. KANOUN Khedoudja., MCA, UDL Sidi-Bel-Abbès

Mr. BENREGUIEG Mokhtar., MCA, UTM Saïda

Mr. GHELLAI Lotfi., MCA, UTM Saïda

Directeur de thèse :

Mr. KHALED Méghit Boumédiène., Professeur, UDL Sidi-Bel-Abbès

Co-directrice de thèse :

Mme. BENMECHERNENE Zineb., Professeur, Université Oran 1

Année Universitaire : 2020/2021

***Guedid* ; analyses physicochimiques et
microbiologiques, identification
phénétique et évaluation probiotique
du microbiote lactique**

Avant-propos

« Un grand rêve à besoin d'un grand plan et un grand plan nécessite un grand rêve » ce dicton peut aussi être repris avec discernement afin de chercher le doctorat, à côté de ceci, un précieux conseil fus venu de mon enseignant encadrant d'ingénieur, disant "de garder le même axe si je poursuis mes études en post graduation ". My voilà, garder le même axe et le même encadrant en magister comme en doctorat. Si ce double bon mot a pour vocation de me faire escorter tout au long de mon parcours, il a aussi pour ambition d'exécuterait avec succès mon plan formé aussitôt, mon grand rêve convoité autrefois...

*Ce travail de doctorat est dédié
A ma mère et à la mémoire de mon père
A mes frères et sœurs, neveux & nièces
A ma femme
A mes enfants Nadri Mohamed Abdelrahim, Malek Aman & Leena Rahil.*

ملخص

تنطلق هذه الدراسة من الخطر المشترك للمواد الكيميائية والمكروبات المُستَبَبة للأمراض، الأمر الذي يفسر الحاجة إلى الأغذية (الطبيعية، الوظيفية، العضوية) لما لها من قيمة غذائية وقدرة على تحسين الصحة.

أُخذت الدراسة من اللحم المقدد (*Guedid*) مادة لها من خلال التحليل الفيزيائي كيميائي والمكروبيولوجي، وكذا تحديد البكتيريا اللبنية وتعريفها وتقييم خاصية البروبيوتيك لديها.

أظهرت نتائج الدراسة في الجزء الأول القيم التالية: جراثيم هوائية ($1.15 \cdot 10^5 \pm 6.07 \cdot 10^4$)، بكتيريا القولون ($3.18 \pm 1.56 \cdot 10^3$)، ستافيلوكوك أورييس ($5.99 \cdot 10^3 \pm 5 \cdot 10^3$)، بكتيريا لبنية ($1.36 \cdot 10^4 \pm 9.75 \cdot 10^3$)، خائر ($1.4 \cdot 10^5 \pm 8.96 \cdot 10^4$) والعفنات ($6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$)، في حين سُجِّل غياب كل من بكتيريا القولون المنتحلة للحرارة والجراثيم اللاهوائية المُرجعة للسلفيت وسالمونيلا (>10). في حين كانت الرطوبة (5.94%)، المادة الجافة (94.04%)، الملوحة (1.24%)، درجة الحموضة (5.81) و a_w (>0.87%). مما يجعل هذه النتائج مهمة وغنية بالمعلومات العلمية في ظلّ عدم وجود معايير جودة.

وأُسفرت في الجزء الثاني عن أن البكتيريا اللبنية خُلقت تنبؤًا بمقدار 10 إلى 30 ملم تجاه مُسببات الأمراض: باسيليس سيريس ATCC 11778، ستافيلوكوك أورييس ATCC 25923، أنتروكوكيس فكاليس ATCC 29212، ليستيريا إيفانوفا ATCC 19119، كلوستريديوم بارفنجنس CECT 486، ليكشف نهج التحليل العددي لمجمل الاختبارات عن اقتراح الأجناس الأكثر ملاءمة التالية: *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* و *Weisella* مع قيم تعريف من جيدة إلى ممتازة.

أفضت الدراسة في الجزء الثالث إلى تنبؤ: *Aerococcus sp.* Lbm19، *Enterococcus sp.* Lbm49، *Aerococcus sp.* Lbm18، *Aerococcus sp.* Lbm3 و *Enterococcus sp.* Lbm46، لما لها من إمكانات بروبيوتيك واعدة بنسب أكثر من 55%: عمل مضاد للمكروبات المُستَبَبة للأمراض ودرجة الحموضة بقدر 3.5 في المرحلة الثابتة من النمو، حساسية للحرارة وللانزيمات (α -chymotrypsin و pepsine)، حساسية للحرارة عند $60 \text{ }^\circ\text{C}$ / 30 د، قدرة هضم البروتين، إنتاج (EPS و acétoïne)، إلى جانب ما تقدّم، سجّلت نسبة تلاشي بمقدار 1 إلى 2 وحدة لوغاريتمية عند درجة الحموضة 2 و 3 وظروف محيط الجهاز الهضمي، امتصاص الكوليسترول بنسبة تصل إلى 89%، غياب (gélatinase)، *hémolysines* و *hydrolase des sels biliaires*)، حساسية اتجاه المضادات الحيوية باستثناء فانكوميسينوسلفايريم مع معاملات 0.72 إلى 0.90. إجمالاً مكّنت الدراسة من تكوين مكتبة سلالات تضم ما لا يقل عن ثلاثين (30) نوعاً من البكتيريا اللبنية ذات قيمة بروبيوتيك لها خصائص وقائية، تكنولوجية ووظيفية مثيرة للاهتمام يمكن اعتبارها غذاءً حيويًا أو مكملًا طبيًا، خاصة بالنسبة للشركات المحلية الناشئة من أجل تلبية حاجات المستهلك. ومع ما توصلت إليه الدراسة تظلّ الدراسات المتممة ضرورية، لا سيما من أجل التحديد والتعريف الجزيئي للسلالات وتأكيد النتائج المخبرية باختبارات خارج الجسم الحي ودخله.

الكلمات المفتاحية: اللحم المقدد، البروبيوتيك، البكتيريا اللبنية

Résumé

Le risque combiné de substances chimiques et de microorganismes pathogènes justifie la demande émergente du consommateur pour des aliments fonctionnels « bio » qui, au-delà de l'apport nutritionnel, sont capables d'améliorer la santé. L'objectif principal de la présente thèse était d'étudier le *Guedid*, un produit de terroir traditionnel, par des déterminations physicochimiques et microbiologiques suivies d'une identification phénétique et évaluation probiotique de son microbiote lactique. Dans la première partie de l'étude, les charges moyennes en UFC/g d'échantillon de départ étaient respectivement : $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$, $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$, $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$, $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$ et $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$ pour les germes aérobies, les Coliformes, *St. aureus*, les bactéries lactiques, les Levures et Moisissures. Une absence de Coliformes fécaux, de bactéries sulfito-réductrices et de Salmonelles a été notée (< 10 UFC/g). Pour ce qui est de l'humidité et de la matière sèche, ainsi que la salinité et le pH, et l' a_w les valeurs étaient respectivement estimées à : 5.94 % et 94.04 %, 1.24 % et 5.81, et < 0.87 % respectivement. L'absence de normes et/ou de standards de qualité permet d'attribuer à ces résultats une grande importance informative pour ce produit de terroir considéré comme « bio ». Dans la deuxième partie, le microbiote lactique a exhibé une inhibition de l'ordre de 10 à 30 mm envers les pathogènes : *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212, *L. ivanovii* ATCC 19119, et *Cl. perfringens* CECT 486. Pour l'identification phénétique, l'approche numérique a permis de proposer les genres les plus appropriés : *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* et *Tetragenococcus* avec des IDs et des tests de probabilité bons à excellents. Dans la troisième partie, l'évaluation probiotique *in vitro* a élu les candidats ; *Enterococcus* sp. Lbm49, *Aerococcus* sp. Lbm19, *Aerococcus* sp. Lbm18, *Enterococcus* sp. Lbm46 et *Aerococcus* sp. Lbm3 pour prometteurs en matière du potentiel probiotique (> 55 %) : un pic antagoniste et un pH 3.5 à la phase stationnaire, surnageants sensibles à la chaleur, à la pepsine et l' α -chymotrypsine, isolats thermosensibles à 60 °C/30min, capacité de digestion des protéines, production des EPS et d'acétoïne davantage, viabilité réduite de 1 à 2 unités log aux pH 2, pH 3 et aux conditions gastro-intestinales, assimilation du cholestérol atteignant les 89 %, absence de gélatinase, d'hémolysines et d'hydrolase des sels biliaires, sensibles aux antibiotiques hormis la vancomycine et le sulfaprim avec des coefficients de 0.72 à 0.90. En conclusion, l'étude a permis de constituer une souchothèque d'au moins trente (30) bactéries lactiques probiotiques à propriétés protectrices, technologiques et fonctionnelles intéressantes et pouvant servir de bio compléments alimentaires ou médicaux surtout pour l'industrie locale startup, ceci afin de répondre aux besoins du consommateur. Toutefois, des études complémentaires restent nécessaires notamment pour une caractérisation moléculaire des isolats élus et une confirmation des résultats par des tests *ex vivo* et *in vivo*.

Mots clés : *Guedid*, probiotique, bactéries lactiques, criblage, identification.

Abstract

The combined risk of chemicals and pathogenic microorganisms explains the emerging consumer demand for organic functional foods that, beyond nutritional intake, are capable of improving health. The aim of the current PhD thesis was to study *Guedid*, a traditional local product, through physicochemical and microbiological determinations followed by a phenetic identification and probiotic assessment of the lactic microbiota. In the first part of the study, the average loads in CFU/g of starting sample were: $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$, $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$, $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$, $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$, $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$ for aerobic bacteria, Coliforms, *St. aureus*, lactic acid bacteria, Yeasts and Molds, alongside an absence of fecal Coliforms, sulfite-reducing bacteria and *Salmonella* respectively. Concerning humidity and dry matter, salinity and pH, and a_w the obtained values were: 5.94 % and 94.04 %, 1.24 % and 5.81%, and < 0.87 % respectively. The lack of norms and/or quality standards makes these results important and informative for this local product. In the second part, the lactic microbiota exhibited an inhibition of 10 to 30 mm towards the pathogens: *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 and *L. ivanovii* ATCC 19119, *C. perfringens* CECT 486. For phenetic identification, the numerical approach made it possible to propose the most appropriate genera: *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Weisella* and *Tetragenococcus* with good to excellent IDs and probability tests. In the third part, the probiotic *in vitro* evaluation elected the candidates; *Enterococcus sp.* Lbm49, *Aerococcus sp.* Lbm19, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46 and *Aerococcus sp.* Lbm3 for promising probiotic potential (> 55 %): peak antagonist and pH 3.5 at stationary phase, supernatants sensitive to heat, pepsin and α -chymotrypsin, isolates thermosensitive at $60^\circ \text{C}/30\text{min}$, capacity protein digestion, production of EPS and acetoin more, viability reduced by 1 to 2 log units at pH 2, pH 3 and gastrointestinal conditions, cholesterol uptake up to 89 %, absence of gelatinase, hemolysins and hydrolase of bile salts, sensitive to antibiotics except vancomycin and sulfaprim with coefficients of 0.72 to 0.90. In conclusion, the present study allowed us to constitute a strain library of at least thirty (30) probiotic lactic acid bacteria with interesting protective, technological, and functional properties that could serve as bio-food or medical supplements, especially for the local startup industries, in order to meet consumer needs. However, additional studies remain necessary, especially for molecular characterization of the selected isolates and a confirmation of the results by *ex vivo* and *in vivo* tests.

Key words: *Guedid*, probiotic, lactic acid bacteria, screening, identification.

Liste des tableaux

Tableau 2.1	Résultats de déterminations microbiologiques de la viande salée et séchée traditionnelle	20
Tableau 2.2	Résultats de déterminations physicochimiques de la viande traditionnelle salée et séchée	21
Tableau 3.1	Clés de différenciation des bactéries lactiques (Orla-Jensen, 1919)	39
Tableau 3.2	Clé de différenciation des bactéries lactiques (genres communs et caractéristiques différentielles) (Von Wright & Axelsson, 2012)	42
Tableau 3.3	Classification et caractéristiques des bactériocines des bactéries lactiques en deux types selon le type de gram du producteur (Rebuffat, 2011 ; Cotter <i>et al.</i> , 2005)	52
Tableau 3.4	Classification et caractéristiques des bactériocines des bactéries lactiques (Klaenhammer, 1993)	53
Tableau 3.5	Souches indicatrices	58
Tableau 3.6	Résultats du screening (<i>spot agar test</i>) des isolats de bactéries lactiques sur géloses MRS et MRS-T	67
Tableau 3.7	Résultats d'analyse numérique d'identification phénétique des isolats lactiques les plus performants	72
Tableau 3.8	Résultats de la fermentation des sucres des isolats lactiques les plus performants	75
Tableau 4.1	Critères de sélection des probiotiques (FAO/OMS, 2002)	110
Tableau 4.2	Résultats du suivi cinétique de production de l'agent inhibiteur	131
Tableau 4.3	Résultats du suivi cinétique de croissance (DO)	131
Tableau 4.4	Résultats du suivi cinétique du pH	132
Tableau 4.5	Résultats du pouvoir lipo-, protéo- et amylolytique ; de la production d'EPS et d'acétoïne ; et de la thermorésistance	136
Tableau 4.6	Résultats des taux de survie dans les conditions acides et assimilation du cholestérol	137
Tableau 4.7	Résultats des taux de survie dans les conditions gastriques et intestinales simulées	138
Tableau 4.8	Résultats d'hydrolase des sels biliaires, gélatinase et hémolyse	139
Tableau 4.9	Potentiel technologique et probiotique, et taux de croissance	140

Liste des figures

Figure 2.1	Souches pathogènes : (S_{K2}) <i>Staphylococcus sp.</i> ; (E_{K8}) et (E_{K11}) sur milieux sélectifs BP, Hektoen et VRBG	18
Figure 2.2	Résultats de déterminations microbiologiques de la viande salée et séchée traditionnelle	19
Figure 2.3	Résultats de déterminations physicochimiques de la viande traditionnelle salée et séchée	21
Figure 3.1	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (barre indique une divergence de séquence estimée de 5%) (Vos <i>et al.</i> , 2009)	43
Figure 3.2	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et certains <i>Firmicutes</i> aérobies et facultative anaérobies (distances évolutives approximatives) (Von Wright & Axelsson, 2012)	43
Figure 3.3	Mécanisme d'action des bactériocines selon les classes. (a) classe II. (b) classe I, effet de la nisine. (c) classe III. (d) membrane cytoplasmique. (e) lipide II (de Souza <i>et al.</i> , 2017)	50
Figure 3.4	Isolats de groupe de genre de bactéries lactiques. (a) <i>Guedid</i> ; (b) gélose (MRS-Ac pH 5.2 et MRS-VBC-V) ; (c, d) aspect de colonies des bactéries lactiques ; (e, f) purification	65
Figure 3.5	Résultats des tests d'orientation des isolats de bactéries lactiques les plus performants : coloration de gram ; (a) test de catalase ; (b) test de sporulation	66
Figure 3.6	Résultats du screening primaire (<i>spot agar test</i>) des isolats de bactéries lactiques les plus performants	68
Figure 3.7	Résultats du screening secondaire (<i>well diffusion assay</i>) des isolats de bactéries lactiques les plus performants	68
Figure 3.8	Résultats des tests d'identification des isolats lactiques : (a) ensemencement ; (b) CO ₂ ; (c) H ₂ S et mobilité ; (d, e, f) croissance à différentes (T°, pH, NaCl) ; (j) ADH ; (h) uréase ; (i) nitrates et (j) fermentation des sucres	71
Figure 4.1	Arbre phylogénétique des différents groupes bactériens probiotiques (de Melo Pereira <i>et al.</i> , 2018)	106
Figure 4.2	Critères clés et souhaitables de sélection des probiotiques pour applications alimentaires (Harzallah & Belhadj, 2013 ; Vasiljevic & Shah, 2008)	110
Figure 4.3	Mécanismes d'action des probiotiques à l'intérieur de l'intestin : (a) exclusion compétitive des pathogènes, (b) production de substances antimicrobiennes, (c) concurrence pour les nutriments et les facteurs de croissance, (d) augmentation de l'adhérence à la muqueuse intestinale, (e) fonction de barrière épithéliale améliorée, (f) stimulation immunitaire (sécrétion d'Ig A améliorée) (Hossain <i>et al.</i> , 2017)	111

Figure 4.4	Schéma des lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques à usage alimentaire (FAO/OMS, 2002)	117
Figure 4.5	Approche systématique de criblage et évaluation protectifs, fonctionnels et technologiques requis selon les lignes directrices de la FAO/OMS, (2002) et autres études (de Melo Pereira <i>et al.</i> , 2018)	119
Figure 4.6	Résultats de l'activité antimicrobienne ; (□) acidité (pH), (■) suivi cinétique de croissance (DO 620 nm), et (●) activité bactériocénogénique anti- <i>St. aureus</i> ATCC 25923	133
Figure 4.7	Résultats de la capacité ; (a) lipo- ; (b) protéo- ; (c) amylolytique ; (d) EPS ; (e) acétoïne ; (f) thermorésistance ; (g) survie dans les conditions acides, gastriques et intestinales ; (h) sels biliaires ; (i) hémolyse ; (k) gélatine ; et (i) résistances aux antibiotiques	141
Figure 4.8	Résultats des taux de survie dans des conditions : (a) pH 2, (b) pH 3, (c) gastrique, (d) intestinales ; (e) taux assimilation du cholestérol ; et (f) coefficient de sensibilité à l'égard des antibiotiques ; (g) Potentiel technologiques et probiotique cumulé	142

Liste des abréviations et acronymes

FAO	<i>Food and Agriculture Organisation</i>
OMS	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ISAPP	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
NA	Norme Algérienne
ISO	Organisation internationale de normalisation
NFV	Norme Française
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>En.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bf.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Ca.</i>	<i>Candida</i>
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sa.</i>	<i>Salmonella</i>
MRS-V-VBC	MRS supplémentée avec le vert de bromocrésol et la vancomycine
MRS-Ac	MRS acidifiée
MRS-BCP	MRS supplémentée avec de pourpre de bromocrésol
MRS-BCP-A	MRS supplémentée avec de pourpre de bromocrésol et de l'arginine
MRS-G	MRS additionné au glycérol
EPS	Exopolysaccharides
PBS	Solution tampon phosphate saline
BSH	Hydrolase des sels biliaires
ECR	Essais Cliniques Randomisés

Chapitre 1

Introduction générale

1.1	Contexte	2
1.2	Lieu de l'étude	3
1.3	Objectifs de l'étude	3
1.4	Valorisation de l'étude	4
1.5	Organisation du manuscrit	5

Chapitre 1

Introduction générale

1.1 Contexte

Le risque que présentent les microorganismes pathogènes et les agents de conservation alimentaires de synthèse chimique sur la santé du consommateur a accru la demande au screening, le développement et l'adoption des agents nouveaux plus naturels, plus sains, conservateurs et fonctionnels recherchés le plus souvent dans des biotopes alimentaires, environnements naturels et dans certains produits de terroir qui méritent d'être valorisés comme la viande *Guedid*. Les candidats gardes alimentaires potentiels comprennent ; les bactériophages, les bactériocines, les sidérophores, le *quorum sensing* (QS) (la présence d'une espèce pouvant influencer la croissance d'une autre), les bactéries et Levures probiotiques de première et deuxième génération, ainsi que divers métabolites primaires et secondaires.

Les probiotiques sont dotés de propriétés protectrices, technologiques et fonctionnelles. Ils constituent un bon moyen de contrôle des microbes nuisibles à gram positif et négatif, aussi les Levures et les Moisissures en inhibant leur croissance. De ce fait ce sont de bon promoteurs futurs alternatifs aux antibiotiques, agents de l'amélioration de la sécurité et la stabilité alimentaire assurant une longue durée de vie. Cette propriété protectrice se réfère à la production d'acides organiques, le diacétyle, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de bactériocines. L'activité acidifiante et la production de diacétyle, à côté d'autres composés issues de la fermentation des glucides comme les exopolysaccharides (EPS), les enzymes, les acides aminés aromatiques, les composés soufrés, et les acides gras libres, fournissant ainsi des propriétés technologiques souhaitables aux produits alimentaires. De plus, les probiotiques libèrent d'autres composés comme les vitamines, les peptides et les lipides bioactifs qui peuvent donner des propriétés fonctionnelles et divers bienfaits sur la santé.

Pour la sélection de nouveaux candidats probiotiques, une approche systématique de criblage et évaluation via une séquence de tests protectifs, fonctionnels et technologiques sont requis pour qu'un produit ou une souche soient qualifiés de probiotiques. Les lignes directrices recommandées par la FAO (*Food and Agriculture Organisation*) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) constituent un ensemble de paramètres actuellement utilisés par la quasi-totalité des chercheurs de nouveaux probiotiques sont : la tolérance à l'acidité gastrique et aux acides biliaries, l'adhérence au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines et aux lignées cellulaires, l'activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes, la capacité à réduire l'adhérence des agents pathogènes aux surfaces, l'activité d'hydrolase des sels biliaries, la résistance aux spermicides.

1.2 Lieu de l'étude

La quasi-totalité des expérimentations a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée du centre universitaire NOUR Bachir El-Bayadh. Quelques expérimentations ont eu lieu au laboratoire de contrôle de qualité et de la répression des fraudes (Saïda) du Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage (CACQE).

1.3 Objectifs de l'étude

Cette présente étude expose les données des expérimentaux *in vitro* effectuées sur les échantillons de la viande *Guedid* et pour la détermination de ses caractéristiques physicochimiques et microbiologiques ainsi que l'évaluation des effets probiotiques de son microbiote lactique vis-à-vis de la santé du consommateur. Les objectifs assignés se résument comme suit :

- Objectif 1 : analyse physicochimique et microbiologique du microenvironnement de *Guedid* ;
- Objectif 2 : évaluation de l'effet antibactérien et identification phénétique de bactéries lactiques ;
- Objectif 3 : étude *in vitro* de l'effet probiotique des isolats lactiques les plus performants.

1.4 Valorisation de l'étude

a. Publications

- Naimi, M., Abid, O., & Khaled, M. B. (2020, February). Probiotic Screening of Ten Lactic Acid Bacteria from Traditional Algerians Dried Meat (KHLIAA). In JOURNAL OF CLINICAL GASTROENTEROLOGY (Vol. 54, pp. S15-S15). TWO COMMERCE SQ, 2001 MARKET ST, PHILADELPHIA, PA 19103 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.

Impact Factor: 2.973 ; indexation: science Citation Index, Current Contents/Clinical Medicine, Index Medicus/MEDLINE/PubMed, etc.

- Naimi, M., Abid, O., & Khaled, M. B. (2021). PRELIMINARY PROBIOTIC POTENTIAL OF SELECTED AEROCOCCUS SPP., ENTEROCOCCUS SPP., AND WEISELLA SP. FROM ALGERIAN GUEDID. In Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. JUNE – JULY, 2021, VOL. 10, NO. 6.

Catégorisation : B ; indexation: Scopus, Web of Science, DOAJ, etc.

- Probiotic and technological properties of autochthonous *Lactobacillus*, *Enterococcus Aerococcus*, *Weissella* and *Tetragenococcus* species from Algerian *Guedid* (en cours d'évaluation) « *Beneficial Microbes* »

b. Communications orales

- Naimi, M., Abid, A., Maameri, S., Khaled, M. B. (2019). Caractérisation probiotique d'isolats lactiques de genres : *Aerococcus spp.*, *Enterococcus spp.* et *Weissella sp.* à partir de la viande salée et séchée (Khliaa), cas à partir du Sud-Ouest Algérien, 3^{ème} Séminaire National 'Biologie & Santé', Décembre 2019, Sidi-Bel-Abbès, Algérie.

c. Communications poster

- Naimi, M., Abid, O., & Khaled, M. B. (2019). Probiotic screening of ten lactic acid bacteria from traditional algerians dried meat (khliaa) ". 10th probiotics, prebiotics & new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & human and microbiota health, université pontificale urbaniene, Rome, Italie.
- Naimi, M., Abid, O., & Khaled, M. B. (2019). Probiotic screening of ten lactic acid bacteria from traditional algerians dried meat (khliaa) ". 5^{ème} congrès international des Biotechnologies microbiennes, (BIOMIODS), association Marocaine de Microbiologie (AMM) et l'université Al Akhawayn, Ifran, Maroc.

1.5 Organisation du manuscrit

Le travail est présenté en trois parties sous forme d'articles de recherche séparés, chaque partie comporte son propre résumé, introduction, matériel et méthodes, résultats et discussion, conclusions, et ses références bibliographiques.

- Ainsi, la première partie s'intitule : *Analyses physicochimiques et microbiologiques du microenvironnement de Guedid* qui est introduite par une synthèse bibliographique portée sur les viandes, types et technologies de conservation. Son volet expérimental consiste à la recherche de la numération de neuf (9) microorganismes et la détermination de cinq (5) paramètres physicochimiques réalisées conformément aux normes : norme algérienne (NA), organisation internationale de normalisation (ISO) et norme française (NFV).
- Quant à la deuxième partie, celle-ci s'intitule : *recherche de l'activité antibactérienne et identification phénétique du microbiote lactiques de Guedid*, sa revue de littérature cerne les bactéries lactiques ; classification, description, morphologie et physiologie, métabolisme, composés antimicrobiens et application technologiques. Dans cette partie, une étude de l'activité antimicrobienne sur gélose et une identification phénétiques des bactéries lactiques sont entretenues.
- Tandis que la dernière partie s'intitule : *évaluation probiotique des genres lactiques Aerococcus spp., Enterococcus spp. et Weisella sp. de Guedid*, son introduction mis en crête les probiotiques, critère de sélection, vertus, et différentes applications. Le volet pratique de cette partie évalue *in vitro* les aptitudes protectifs, fonctionnels, technologiques et sécuritaire qui peuvent déminer le profile probiotique des isolats candidats les plus performants.

Dans son ensemble, le travail est initié par une introduction générale qui porte sur le contexte, le lieu, les objectifs, la contribution et l'organisation de l'étude. Il se termine par une conclusion générale qui inclue les principaux résultats, les limites de l'étude ainsi que les perspectives et les travaux futurs.

Chapitre 2

Analyses physicochimiques et microbiologiques du microenvironnement de *Guedid*

2.1	Résumé	7
2.2	Introduction	8
2.3	Matériel et méthodes	11
2.4	Résultats	16
2.5	Discussion	22
2.6	Conclusion	26
2.7	Références bibliographiques	27

2.1 Résumé

L'objectif de la présente partie était la mise en évidence et la numération de quelques germes composant le microbiote de dix-sept (17) portions de viande, salée et séchée, traditionnelle *Guedid* prélevées dans le Sud-ouest de l'Algérie. Ce produit du terroir algérien mérite d'être analysé afin d'alimenter l'élaboration de standards de qualité des produits naturels, préparés « bio ». Le *Guedid* est préparé à base de morceaux de viande fraîche d'agneaux. L'échantillonnage, la préparation des échantillons pour l'analyse, la recherche et le dénombrement de neuf (9) germes, à indice alimentaire : germes aérobies, Coliformes et Coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus* et autres espèces, bactéries lactiques et sulfito-réductrices, les Salmonelles et les Levures et Moisissures. De plus, cinq (5) déterminations physicochimiques ont été effectuées en vue de déterminer : l'humidité et la matière sèche, la salinité, le pH et a_w . L'ensemble des paramètres a été entrepris conformément aux normes : NA, ISO et NFV. Qu'à l'issue, les charges moyennes en UFC/g d'échantillon de départ ont été : $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$, $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$, $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$, $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$ et $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$ pour les germes aérobies, Coliformes, *St. aureus*, bactéries lactiques, Levures et Moisissures. Nous avons noté une absence (< 10 UFC/g) de Coliformes fécaux, bactéries sulfito-réductrices et Salmonelles. Pour ce qui est de l'humidité et la matière sèche, la salinité, le pH, et l' a_w ils ont été de : 5.94 % et 94.04 %, 1.24 % et 5.81, < 0.87 %, respectivement. Ces résultats montrent des valeurs similaires avec des études antérieures. L'absence de normes et/ou de standards de qualité pour ce type de produit de terroir à base de viande rend ces résultats importants et informatifs.

Mots clés : *Guedid*, microbiote, détermination physicochimique, standards de qualité.

2.2 Introduction

Signifiante de la nourriture ou encore ce qui sert à la vie, la viande est une matière composée essentiellement d'eau et de matière sèche regroupant ; les protides et les acides aminés, les lipides et les acides gras, les sels minéraux et les vitamines, les glucides et les sucres (FAO, 2008 ; CIV, 2008). Elle sert d'un milieu propice à la croissance de microorganismes, notamment, protéolytiques et lipolytiques (Yacouba, 2009), dont l'origine est très diverse. Ces microorganismes sont responsables, soit de la contamination primaire, résultante des microorganismes en provenance du tube digestif et de la peau, soit de la contamination secondaire, résultante de l'action des microorganismes en provenance de la préparation et de la transformation (Bourgeois *et al.*, 1996). Ces germes contaminants peuvent être regroupés : (i) selon la nature en ; virus (virus aphteux, polyovirus de types 1, 2, 3, virus rabique), bactéries saprophytes et en bactéries pathogènes (sulfite-réductrices, *Salmonella*, *St. aureus*), champignons microscopiques (*Penicillium* et *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Candida*) ; (ii) selon l'origine, ainsi nous trouvons la microflore endogène (*ante-mortem*) et exogène (*post-mortem*), constituées principalement de groupes de : Coliformes, Streptocoques, Pseudomonas, Staphylocoques et Microcoques, Lactobacilles, et Salmonelles (Naimi & Khaled, 2011).

La viande séchée est un produit prêt à être consommé (*ready to eat meat*) avec ou sans reconstitution ou encore ajouté pour assaisonner certaines sauces (Sloan, 2015 ; Yetim & Cankaya, 2001). La microflore, dans la viande séchée, se trouve souvent stabilisée (Zukál & Incze, 2010). La viande ne doit pas être siège de croissance et de production des toxines de microorganismes pathogènes (Coibion & Bailly, 2008 ; FAO, 2000 ; Morisetti, 1971), ni de microorganismes d'altération spécifiques (MAS) « *Specific Spoilage Organisms* » (Labadie, 2006).

Dans le but de réduire leur charge microbienne, plusieurs types de viande trouvent place. Il s'agit de viandes conservées par le moyen le plus le plus usuel ; le froid (Yacouba, 2009). D'autres, sont conservées, traditionnellement, en ajoutant des huiles essentielles (Oussalah *et al.*, 2006), ou sont conservées par d'autres procédés comme le séchage, le salage, le fumage, la friture et la fermentation, dont la plupart de types de produits sont la résultante de la combinaison de ces

derniers procédés (Yacouba, 2009). Aussi, nous trouvons les viandes conservées par irradiation avec des doses de l'ordre de 2-7 kGy (Thayer, 2001). Plus récemment, des viandes sont conservées par recours aux cultures microbiennes, notamment, les bactéries lactiques et leurs métabolites secondaires, comme les bactériocines (Ho, 2008).

En conséquence, une variété de viandes conservées se trouve dans les pays méditerranéens et en Afrique du Nord (Draganski & Highland, 2012 ; Daoudi *et al.*, 2006 ; Bennani *et al.*, 1995). En Algérie, la plus connue est la viande séchée salée *Gueddid*, *Kaddid* ou *Khliiaa*, la moins connue, est la viande *Khliiaa Ezir*, *Laknaf* et le *Frégate* (Gagaoua & Boudechicha, 2018 ; Boudechicha *et al.*, 2017). Dans d'autres pays d'Afrique, d'autres types de viandes sont conservées traditionnellement par le séchage ; le *quitab* (pays du sahel) ; le *charmoute* (Tchad) ; le *kilichi* (Niger) et le *xarque dulce* (Amérique du Sud) (Vindevogel, 2000 ; Kalilou, 1997 ; Garba & Kakalo, 1996). Dans le reste des pays, les produits obtenus par le salage à sec, sont le *biltong* en Afrique du Sud, le *charque* et le *carne-de-sol* au Brésil, le *pastirma* en Turquie et en Égypte et le *tassajo* en Amérique du Sud (Vindevogel, 2000 ; Kalilou, 1997). D'autres viandes fraîches telles que la viande d'autruche ou de chameau sont aussi utilisées pour préparer le *Biltong* dans les traditions sud-africaines (Petit *et al.*, 2014 ; Naidoo & Lindsay, 2010). D'autres produits peuvent être obtenus par le saumurage (en mélangeant l'eau, le sel et divers ingrédients), c'est le cas avec le *sambal daging* en Indonésie et en Malaisie (Maas-van Belkel *et al.*, 2005). D'autres viandes sont conservées avec les composés phénoliques de la fumée telle que le *balangou* au Niger et au Nigeria et du *kitoza* de Madagascar (Yacouba, 2009 ; Maas-van Belkel *et al.*, 2005 ; Laurent, 1981).

Cette diversité de viandes conservées traditionnellement est due aux différentes préparations et modes de transformation, ainsi que les techniques de conservation propres à chaque région. Cela rend difficile de grouper ces viandes (Warfield & Tume, 2000 ; Dawood, 1995). Tout de même, elles peuvent être classées, simplement en trois (3) catégories : (i) viandes salées séchées, (ii) viandes fumées et (iii) viandes cuites (Pearson & Gillet, 1999). Aussi, elles peuvent être classées, selon les modes de transformation (salage, séchage, fumage et fermentation) en cinq (5) catégories : (i) salées non séchées, (ii) fumées, (iii) séchées non fermentées, (iv) fermentées demi- séchées/séchées et (v) cuites et/ou confites dans la graisse (Heinz & Hautzinger, 2007). Également, elles peuvent être

classées, en fonction des traitements associés au séchage ; la forme la plus répandue de transformation traditionnelle de la viande (Nummer *et al.*, 2004 ; Igene *et al.*, 1990 ; Heikal *et al.*, 1973) ; en cinq (5) catégories : (i) viandes séchées non salées, (ii) viandes séchées salées, (iii) viandes séchées fumées, (iv) viandes conservées par la friture et (v) viandes fermentées séchées (Yacouba, 2009).

Les analyses microbiologiques sont des moyens utiles pour évaluer la sécurité (salubrité) et la qualité des aliments, entre autres, la viande prête à consommer (*ready to eat meat*), et les limites microbiologiques applicables, aux produits canés, comprenant généralement le dénombrement des germes aérobies, des germes à aspect hygiénique, comme les Entérobactéries, et les germes à aspect sécuritaire, autrement dit, les germes pathogènes (CFS, 2014 ; OVF, 2006). Plusieurs études traitent les qualités des divers produits alimentaires et cherchent à compter ces germes au moyen des méthodes de la microbiologie classique (Boudechicha *et al.*, 2017 ; Jones *et al.*, 2017 ; Pérez-Petit *et al.*, 2014 ; Kameník, 2013 ; Steinhäuserová *et al.*, 2012 ; Alagić *et al.*, 2011 ; ; Ali *et al.*, 2010 ; Rodríguez *et al.*, 2010 ; Aksu & Kaya, 2005 ; Bennani *et al.*, 1995). D'autres cherchent à les détecter au moyen de méthodes relevant de la microbiologie moléculaire récentes, à l'instar du *typing* par la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), profil sur *SDS-PAGE* (Doulgeraki *et al.*, 2012.), et métagénomique (Zagorec *et al.*, 2012).

Les normes alimentaires sont des règles de mesure établies par une réglementation ou une autorité (Vieira, 2006 ; Reardon *et al.*, 2001) et sont appliquées par les gouvernements, les entreprises et même les détaillants, du secteur alimentaire. Leur objectif, principal, est d'assurer la confiance des consommateurs concernant les aliments qu'ils consomment. Aussi, les normes du produit alimentaire exigent que le produit final présente des caractéristiques spécifiques (Vieira, 2006 ; Caswell, 2003).

Cette première partie de la présente recherche a pour objectif de déterminer le microbiote de ce produit de terroir, ainsi que, le taux de quelques paramètres physicochimiques, qui par la suite, peuvent être informatifs, sur sa qualité et sa sécurité (salubrité), d'abord pour les personnes qui le préparent afin qu'ils peuvent améliorer la technique de préparation pour réduire la

contamination secondaire, ensuite, informatifs pour la communauté scientifique, pour établir, au moins, des standards locaux de qualité.

2.3 Matériel et méthodes

2.3.1 Matériel de paillasse et produits de laboratoire

a. Matériel de paillasse

- Agitateur avec plaque chauffante *Ikamag*[®] ;
- Autoclave *Rexall Industrie*[®] LS ;
- Bain marie *Memmert*[®] ;
- Balance analytique *Sartorius*[®] E 5500S ;
- Balance de précision *Mettler*[®] AE160 ;
- Bec *Mecker*[®] ;
- Compteur de colonie *Schütt*[®] ;
- Dessiccateur en verre ambré ;
- Four Pasteur *P-Selecta*[®] ;
- Incubateur bactériologique *Binder*[®] B 115 ;
- Minuterie avec affichage de température ;
- pH-mètre *Ohaus*[®] ;
- Plaque chauffante *Schott*[®] ;
- Réfrigérateur *Eniem*[®] ;
- Stomacher *Lab Blender*[®] 400.

b. Produits de laboratoire

- Alun de fer ;
- Anse de platine ;
- Appareil photo numérique ;
- Bistouris stériles ;
- Boîtes de Pétri à usage unique ;
- Burette et statif ;
- Capsules en verre ;
- Cartouches d'extraction ;
- Ciseaux ;
- Coton cardé ;
- Cryotubes avec caps à vis ;
- Embouts bleus 1000 µL et embouts jaunes 200 µL ;
- Erlenmeyers à vis 100 mL ;

- Gants en latex ;
- Glacière + deux accumulateurs de froid ;
- Marqueur noir ;
- Micropipettes réglables 10-100 µL et 100-1000 µL ;
- Mortier ;
- Nacelles en porcelaine ;
- Nitrate d'argent (AgNO₃) à 0.1 N ;
- Papiers : Josef, pH, filtre, collant et hygiénique ;
- Pince stérile ;
- Pipettes Pasteur ;
- Pipettes en verre ;
- Portoir métallique ;
- Sachets de prélèvements stériles ;
- Scalpel stérile ;
- Verrerie sèche et propre ;
- Spatule ;
- Éthanol à 95° ;
- Solution de phénolphtaléine à 1 % (m/v) ;
- Solution tampon pH 4, pH 7.01 ;
- Soude solution (NaOH solution à 8 N et à 0.1 N) ;
- EPT (Eau Peptonée Tamponnée) ;
- Sulfite de sodium ;
- Tellurite de potassium ;
- TSE (Tryptone Sel Eau) ;
- Vert de Bromocrésol ;
- BP (*Baird Parker agar base, Pronadisa™*)
- *Hektoen agar, Pronadisa™* ;
- MRS (*De Man., Rogosa & Sharpe, Pronadisa™*) ;
- OGA (*Oxytetracycline Glucose Agar, Pronadisa™*) ;
- PCA (*Plate Count Agar, Pronadisa™*) ;
- SFB (*Selenite F Broth, Pronadisa™*) ;
- VF (*Liver Agar, Pronadisa™*) ;
- VRBG (*Violet Rouge Bile Agar, Pronadisa™*).

2.3.2 Échantillonnage et préparation en vue d'analyses

Dix-sept (17) échantillons de viande salée et séchée (*Guedid*) ont été collectionnés (collectés) à partir de la région Sud-ouest de l'Algérie, dont quatre (4) de Saïda, un (1) de Nâama, (1) de Bougtob, (4) d'El-Bayadh, (4) d'Adrar, et (3) de Mascara. Les échantillons ont été enroulés dans des bandes à gaz et mis dans des boîtes de conserve, en plastique convenables, propres et stériles

afin d'éviter toute influence sur la microflore du produit. Ensuite, les échantillons ont été conservés à la température de froid négatif (à -18 °C) (congélateur *Eniem*®), par la suite transportés à une température inférieure à 40 °C (produit stable à la température ambiante) et examinés dans les 24 h par recherche et dénombrement de germes à indice alimentaire (NA 644).

2.3.3 Prises d'essai, dilutions mères et dilutions décimales

À partir des échantillons de viandes sujets à l'analyse, 10 g découpés en petits morceaux, à l'aide d'une lame bistouri (en forme de petits dés), ont été prélevés aseptiquement et pesés à l'aide d'une balance analytique (*Sartorius*® E 5500 S) dans des sachets Stomacher stériles, auxquels ont été rajoutés, dans les conditions d'asepsie, 90 mL du diluant stérile TSE (Tryptone Sel Eau : tryptone 1 g, chlorures de sodium 8.5 g, eau distillée 1000 mL). Ensuite, le mélange a été agité pendant une minute dans un homogénéisateur péristaltique du type Stomacher (*Lab Blender*® 400). Cette première opération est afin de réaliser les dilutions mères à titre de 10^{-1} , qu'à desquelles des dilutions décimales à titre de 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} ont été préparées dans des tubes à essai contenant 9 mL du même diluant stérile (NA 12.97.73).

2.3.4 Recherche et dénombrement des germes aérobies

Le dénombrement des germes aérobies a été effectué conformément à la norme NA 12.95.52. Pour cela, 1 mL de la dilution mère et des dilutions décimales a été ensemencé en profondeur de la gélose pour dénombrement (*PCA, Pronadisa*™), dans des boîtes de Pétri en matière plastique stériles, à raison de deux boîtes par dilution. L'incubation a été faite, en aérobiose, dans l'incubateur bactériologique (*Binder*® B 115), pendant 72 h à 30 °C.

2.3.5 Recherche et dénombrement des Coliformes et Coliformes fécaux

La recherche des Coliformes et Coliformes fécaux a été faite conformément à la norme NA 6803/ISO 4832. Une aliquote de 1 mL de chaque dilution mère et décimale a été ensemencée en profondeur de la gélose sélective lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (*VRBG, Pronadisa*™), coulée dans deux biotes de Pétri, une deuxième couche de la même gélose a été

rajoutée. L'incubation a été faite en double, à 37 °C et à 44 °C dans l'incubateur (*Binder*® B 115) pendant 24 h.

2.3.6 Recherches et dénombrement des Staphylocoques (*St. aureus* et autres espèces)

La mise en évidence directe de *St. aureus*, coagulase positive, a été faite, conformément à la norme ISO 6888/1. L'ensemencement de 0.1 mL a été réalisé sur la surface de la gélose sélective Baird Parker (*BP, Pronadisa*™), ceci à raison de deux boîtes par dilution (mère et décimales) et l'incubation a duré 48 h à 37 °C dans l'incubateur (*Binder*® B 115).

2.3.7 Recherche et dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement de microbiote lactique a été effectué, en appliquant la norme NA 1903/NFV 04-503. Ceci par ensemencement en profondeur de 1 mL de la dilution mère et de la décimale 10⁻², sur la gélose *De Man Rogosa et Sharpe (MRS, Pronadisa*™) en double. Les boîtes ont été placées dans un dessiccateur à l'intérieur de l'incubateur (*Binder*® B 115) réglé à 25 °C pendant 72 h. L'utilisation de dessiccateur a pour objectif d'assurer les conditions d'anaérobiose partielle.

2.3.8 Recherche et dénombrement des bactéries sulfito-réductrices

Les germes sulfito-réducteurs ont été investigués conformément à la norme NA 15176 consacrée à l'énumération de ces pathogènes. Les tubes doubles ont été d'abord remplis avec 10 mL de la gélose viande fois (VF, *Pronadisa*™) au sulfite de sodium et alun de fer, puis 1 mL de la prise d'essai (dilution mère) et des dilutions décimales, a été introduit (en profondeur). Ensuite, Les tubes ont été totalement remplis, fermés en évitant la formation de bulles d'air et incubés à 37 °C pendant 24 h à 48 h (lecture finale au bout de 48 h) dans l'incubateur (*Binder*® B 115). La deuxième série de tubes a été incubée à 50 °C.

2.3.9 Recherche et dénombrement des Salmonelles

La recherche des Salmonelles a été réalisée en se référant à la norme **NA 1203/ISO 6579**. Elle a été effectuée en trois étapes : d'abord un pré enrichissement réalisé en introduisant une quantité de 10 g, de viande, dans un flacon contenant 90 mL de l'EPT (Eau Peptonnée Tamponnée) ; milieu liquide non sélectif, et l'incubation, à cette étape, a été faite à 37 °C pendant 20 h dans l'incubateur (*Binder*® B 115). Ensuite, l'enrichissement a été entrepris par inoculation de 0.1 mL (de la culture obtenue) dans 10 mL de bouillon SFB et incubation à 42 °C pendant 24 h. Enfin, l'isolement sur gélose *Hektoen*, *Pronadisa*™, par étalement en surface de 0.1 mL de la culture obtenue et incubation à 37 °C pendant 24 h.

2.3.10 Recherche et dénombrement des Levures et des Moisissures

La recherche et le dénombrement des Levures et Moisissures ont été concrétisés conformément à la norme **ISO 13681** destinée à leur énumération par ensemencement en profondeur de 1 mL des suspensions diluées (mère et décimales) dans la gélose glucosée à l'oxytétracycline (*OGA*, *Pronadisa*™), préparée préalablement. L'incubation a été faite en aérobiose à 22 °C pendant 3, 4 et 5 jours dans l'incubateur (*Binder*® B 115) réservé pour ce genre de microorganismes.

2.3.11 Déterminations physicochimiques

a. Humidité et matière sèche

La teneur en eau a été déterminée selon la technique décrite dans le journal officiel **JO N° 65-2012**, par mesure de la perte de masse après dessiccation. Pour cela, une capsule en verre a été pesée vide, ensuite tarée. Pour qu'à la suite une prise d'essai de 5 g environ de la viande salée et séchée a été pesée puis introduite dans l'étuve réglée à 103 °C, pour 2 h de séjour. Deux déterminations ont été effectuées pour chaque échantillon. La teneur en eau, exprimée en pourcentage de perte de masse, est donnée par la formule suivante : $m_1 - m_0 / PE \times 100 - 100$, où : m_0 est la masse en grammes de la capsule vide ; m_1 est la masse en grammes de la capsule après

étuvage et PE est la masse en grammes de la prise d'essai. La teneur en matière sèche, exprimée en pourcentage en masse, a été déduite par calcul sur la teneur en eau, donnée par la formule suivante : $MS = 100 - H$, où : MS est la teneur en matière sèche et H est la teneur en eau.

b. Salinité et pH

Le taux du sel alimentaire utilisé lors de préparation de *Guedid*, exprimé en milligrammes de NaCl, a été déterminé selon la méthode de **Mohr**. Tout d'abord, 10 g de la viande ont été mis en solution avec 100 mL d'eau distillée, ensuite à partir de cette solution 1 mL fut pipeté et introduit dans un erlenmeyer contenant 100 mL d'eau distillée, auxquels 2 à 3 gouttes de l'acide nitrique (HNO_3) pur et une pincée de carbonate de chaux ($CaCO_3$) et des gouttes de chromate de potassium (K_2CrO_4) à 10 % ont été rajoutées. Le dosage a été effectué par une solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$) 0.1 N. Le volume (V) de trois essais a été noté et les résultats ont été exprimés suivant la formule : $V \times 10 \times 5.85$. Quant au potentiel en ions hydrogènes, celui-ci a été mesuré selon **NA 12.96.02** avec le pH-mètre en introduisant directement l'électrode combinée (l'électrode de référence et de mesure) dans la solution déjà préparée. Le mesurage a été effectué sur trois fractions.

c. Activité de l'eau (a_w)

L'activité de l'eau a été déduite par calcul sur la teneur en eau, donnée par la formule suivante : $[1 - (WPS \times 0.0052471)] - (0.00012206 \times WPS^2)$, où : WPS est en pourcentage de masse de la concentration de sel dans la phase aqueuse (*Salt in the aqueous or Water Phase*) donnée par : $WPS \% = (\% \text{ sel} / \% \text{ sel} + \% \text{ humidité}) \times 100$ (FSAI, 2017 ; Ross & Dalgaard, 2004).

2.4 Résultats

2.4.1 Résultats de déterminations microbiologiques

L'analyse de la microflore endogène des dix-sept (17) échantillons de viande salée et séchée a comporté neuf (9) paramètres (germes aérobies, Coliformes, Coliformes fécaux et Salmonelles, Staphylocoques, bactéries lactiques et sulfite-réductrices, Levures et Moisissures). Le dénombrement des germes aérobies sur gélose PCA (les boîtes dénombrables contiennent entre 15

et 300 colonies) a donnée, au terme d'incubation en aérobiose, une moyenne de $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$ UFC/g d'échantillon. Le minimum et le maximum des charges ont été situés dans la fourchette de $1.5 \cdot 10^2$ et $3 \cdot 10^5$.

Pour, les Coliformes et les Coliformes fécaux, les énumérations sur gélose VRBG, ont donné, en comptant les boîtes comptant entre 10 et 150 colonies, $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18 \cdot 10^3$ et moins de 10, en UFC/g de viande, respectivement. Avec un taux bas de l'ordre de 10^2 et un autre haut de l'ordre de $1.15 \cdot 10^4$ (Tableau 2.1, Figures 2.1 et 2.2). De même, les Salmonelles ont donné sur gélose Hektoen moins de 10 UFC/g (Tableau 2.1, Figures 2.1 et 2.2). À propos, des individus du groupe d'espèces du genre *Staphylococcus*, après incubation au rapport temps/température approprié, une charge de $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$ a été enregistrée sur les boîtes de la gélose BP ayant entre 10 et 150 colonies. Ce groupe d'espèces avait des quantités, minimales et maximales, de 10^3 et de $1.5 \cdot 10^4$, dans le même ordre (Tableau 2.1, Figures 2.1 et 2.2).

L'énumération des bactéries lactiques pour les dix-sept morceaux de la viande salée et séchée sur gélose sélective MRS a démontré des charges microbiennes de l'ordre de $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$. Ces charges moyennes ont été calculées à partir des valeurs, dont le minimum est de 10^2 et le maximum est de $3 \cdot 10^4$ (Tableau 2.1, Figure 2.2). En ce qui concerne les sulfito-réducteurs, leur comptage sur gélose VF marquée par le noircissement (+ ou -), a donné 0.23 ± 0.43 (Tableau 2.1, Figure 2.2).

Enfin, pour les Levures et Moisissures et en retenant les boîtes d'au moins 150 colonies, le dénombrement a donné $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$ et $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$, respectivement (Tableau 2.1, Figure 2.2).

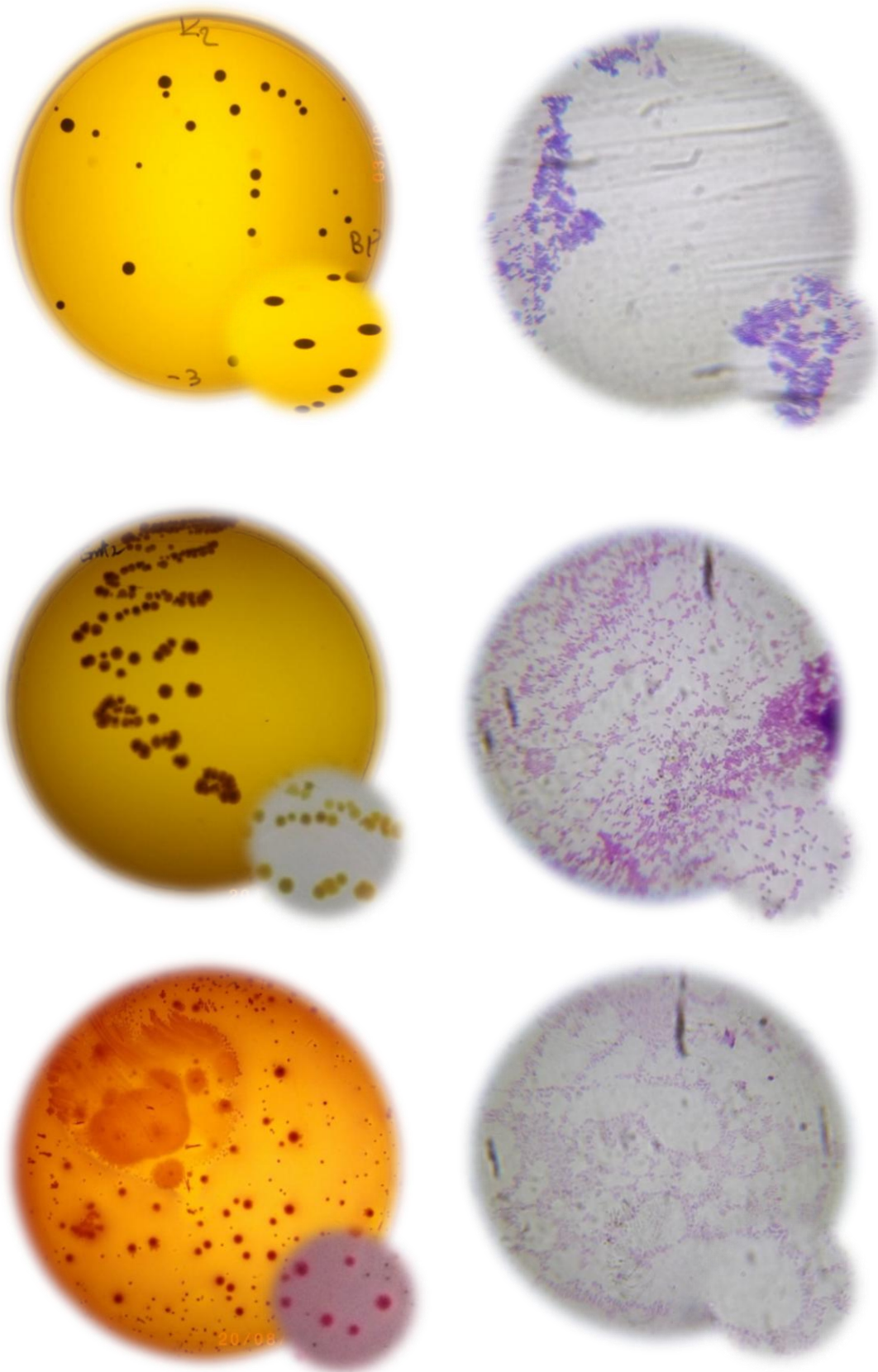


Figure 2.1 : Souches pathogènes : (SK₂) *Staphylococcus* sp. ; (EK₈) et (EK₁₁) sur milieux sélectifs BP, Hektoen et VRBG

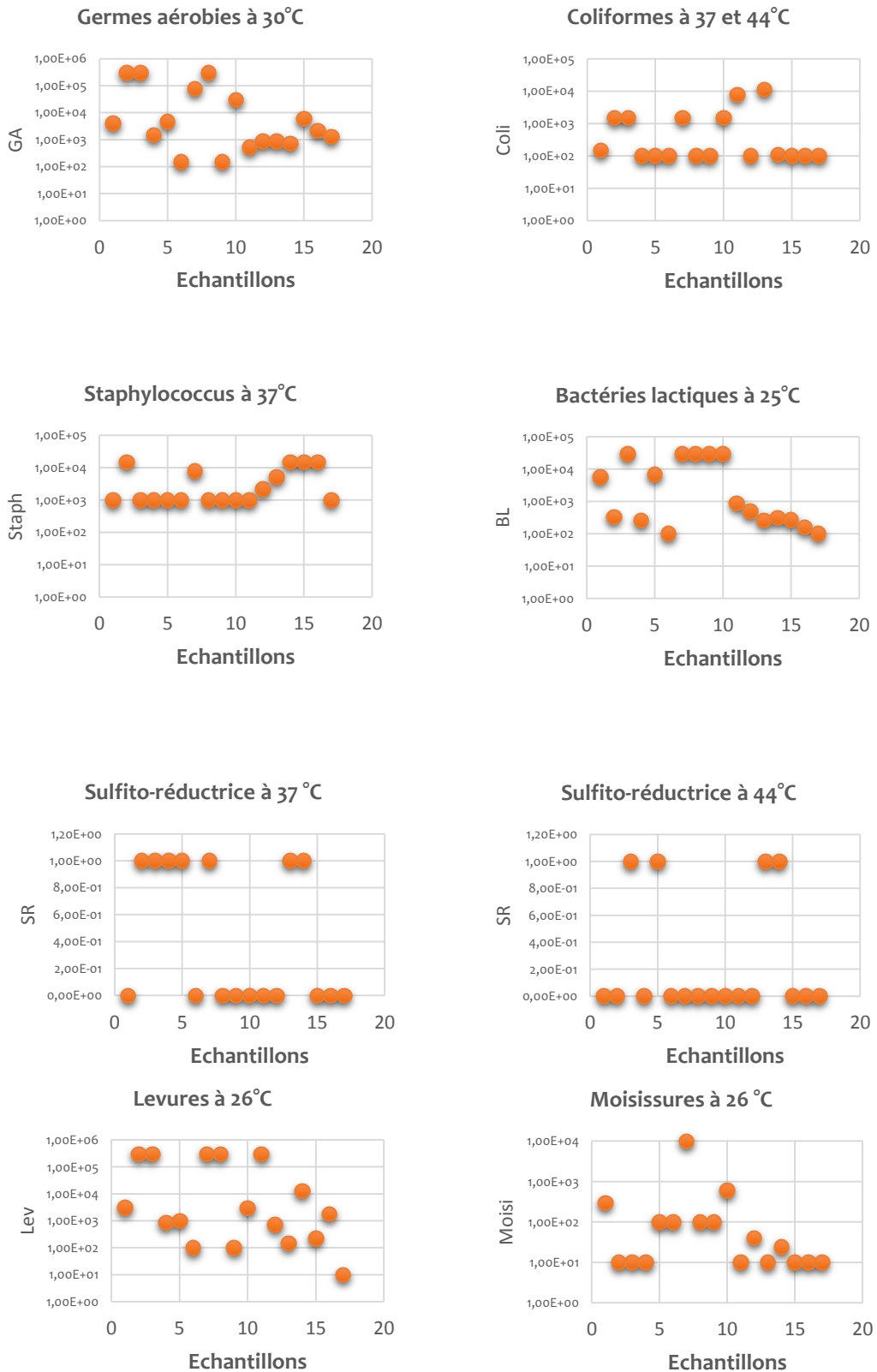


Figure 2.2 : Résultats de déterminations microbiologiques de la viande salée et séchée traditionnelle

Tableau 2.1 : Résultats de déterminations microbiologiques de la viande salée et séchée traditionnelle

Nombre de microorganismes en unités formant colonies par gramme de viande salée et séchée (UFC /g)									
	GA	Coli	Coli.f	Staph	BL	BSR	Sal	L	M
\bar{X}	$6.07 \cdot 10^4$	$1.56 \cdot 10^3$	abs	$5 \cdot 10^3$	$9.75 \cdot 10^3$	0.23	abs	$8.96 \cdot 10^4$	$6.7 \cdot 10^2$
\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm		\pm	\pm
SD	$1.15 \cdot 10^5$	$3.18 \cdot 10^3$		$5.99 \cdot 10^3$	$1.36 \cdot 10^4$	0.43		$1.4 \cdot 10^5$	$2.4 \cdot 10^3$
Min	$1.51 \cdot 10^2$	10^2	-	10^3	10^2	0	-	10	10
Max	$3 \cdot 10^5$	$1.15 \cdot 10^4$	-	$1.5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	1	-	$3 \cdot 10^5$	10^4

GA : Germes aérobies ; Coli : Coliformes ; Coli.f : Coliformes fécaux ; Staph : *Staphylococcus* ; BL : bactéries lactiques ; BSR ; bactéries sulfite-réductrices ; Sal : Salmonelles ; L : Levures et M : Moisissures. + : présence de noircissement ; - : absence de noircissement ; Min : minimum ; Max : maximum.

2.4.2 Résultats de déterminations physicochimiques

Les dix-sept (17) échantillons ont fait l'objet d'une série de déterminations physicochimiques comprenant cinq paramètres : le pH, l'humidité, la matière sèche salinité et l'activité de l'eau.

Les résultats de pH, étaient de 5.81 ± 0.12 (min : 5.6 et max : 6.09). Tandis que, les taux d'humidité, en pourcentage par rapport à la matière totale, ont été de 5.94 ± 1.7 %, venait des taux avec un minimum de 3.78 % et un maximum de 9.45 %. Inversement à ce paramètre, le pourcentage en matière sèche, déduit en complétant à 100 %, était de l'ordre de 94.04 ± 1.7 %. Pour le paramètre de la salinité, celui-ci a donné une valeur moyenne d'environ 1.24 ± 0.65 %, 0.74 % comme valeur basse et 3.42 % comme valeur haute. Enfin pour l'activité de l'eau, celle-ci a donné une valeur moyenne d'ordre 0.87 % (Tableau 2.2, Figure 2.3).

Tableau 2.2 : Résultats de déterminations physicochimiques de la viande traditionnelle salée et séchée

Déterminations physicochimiques valeurs exprimées en pourcentage (%)					
	H %	MS %	Sel %	pH	a _w %
\bar{X}	5.94	94.04	1.24	5.81	0.87
±	±	±	±	±	
SD	1.7	1.7	0.65	0.12	
Min	3.78	90.55	0.74	5.6	
Max	9.45	96.22	3.42	6.09	

H : humidité ; MS : matière sèche ; pH : potentiel d'hydrogène ; Sal : salinité ; Min : minimum ; Max : maximum.

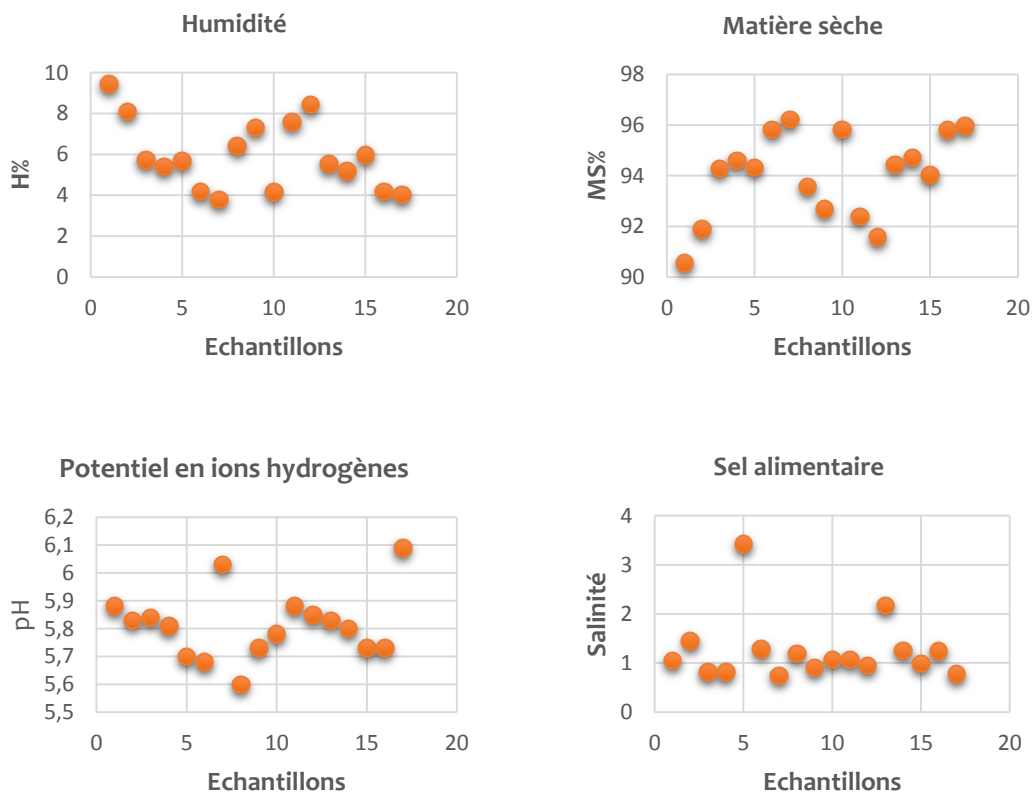


Figure 2.3 : Résultats de déterminations physicochimiques de la viande traditionnelle salée et séchée

2.5 Discussion

L'analyse microbiologique et physicochimique de dix-sept (17) échantillons de la viande salée et séchée *Guedid* ; un produit de terroir Algérien, préparé traditionnellement par l'action combinée de salage et de séchage, étudié dans cette partie de recherche, afin d'évaluer son microbiote, bien que ses aspects hygiénique et sanitaire. La caractérisation microbiologique a été axée sur neuf (9) germes à savoir : les germes aérobies, les Coliformes, Coliformes fécaux et les Salmonelles, les Staphylocoques, les bactéries lactiques et les bactéries sulfito-réductrices, ainsi que les Levures et Moisissures. Tandis que, la caractérisation physicochimique a été portée sur des paramètres abiotiques liés directement à la croissance microbienne ; (5) paramètres à savoir : la teneur en eau (l'humidité ; H %), la teneur en matière sèche (MS %), le taux de salinité (S %) le taux des ions d'hydrogènes (pH), et l'activité de l'eau (a_w).

D'abord, l'analyse a été portée sur les germes aérobies (la flore totale aérobie mésophile ; FTAM), représentée par les microorganismes aptes à se multiplier en aérobiose à une température situant entre les points cardinaux 20 et 45 °C avec, comme optimum, le point 37 °C. La présence de cette microflore est due, généralement, à une contamination plutôt secondaire que primaire, conséquente soit d'une mauvaise hygiène lors de la préparation soit, en cours de la conservation de ce produit. Les résultats, pour ces germes, montrent une diversité en formes coloniales et des variations en charges s'expliquant par la nature de la gélose de dénombrement PCA ; support de croissance de ces microorganismes qui ne sont pas très exigeants sur le plan nutritionnel (gélose ordinaire). Ils ont été aux alentours de la moyenne de $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$ UFC/g d'échantillon. Cette moyenne peut fournir des informations utiles sur la qualité générale et la durée de conservation restante (CFS, 2014). Elle est plus au moins élevée, si comparée avec les résultats de **Boudechicha et al., (2017)**, où une charge de $< \log_{10}$ UFC/g (moins de 10^3), a été trouvée lors de la caractérisation de *Khliia Ezir*, après deux mois de sa préparation ; chose normale puisque leur produit est préparé en additionnant de l'huile d'olive et quelques épices (cumin, coriandre et l'ail) douées d'un pouvoir antimicrobien. Inversement à ceci, cette valeur moyenne est plus au moins proche de celle de $7.5 \cdot 10^5$ qu'ont trouvée, lors de leur étude **Bennani et al., (1995)**. Le microbiote

de la viande est un écosystème complexe impliquant plusieurs types de microorganismes, dont certaines populations de bactéries lactiques à capacité inhibitrice (**Hernández-Aquino et al., 2020**).

Par la suite, l'analyse s'est orientée vers la recherche et le dénombrement des Coliformes et des Coliformes thermotolérants (fécaux) ; un paramètre qui s'inscrit comme indice d'ordre hygiénique. Cette recherche a été réalisée sur gélose VRBG, sélective et riche en nutriments, dont le glucose fermentescible (source à la fois du carbone et d'énergie) qui, à la suite de sa fermentation en présence de l'indicateur de pH (le rouge neutre), se développent des colonies rouges. Le résultat a donné une moyenne de $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18 \cdot 10^3$ et moins de 10 en UFC/g de viande, respectivement, pour les Coliformes et les Coliformes thermotolérants. Ce nombre faible voire nul, pour certains échantillons, est dû, probablement, à la présence de forte concentration de sel alimentaire (NaCl) utilisé comme moyen de conservation pour ce type de viande. La charge moyenne relative à ce groupe de germes est plus au moins proche de celle de $< \log_{10}$ UFC/g trouvée par **Boudechicha et al., (2017)** et de $2.6 \cdot 10^2$ par **Bennani et al., (1995)**. Par ailleurs, le rapport du sel ajouté à cette viande s'est situé autour de la moyenne de 1.24 ± 0.65 % et est ainsi inférieur de celui dévoilé par **Bennani et al., (1995)**, où la concentration était d'environ 10.21 ± 1.68 . En fait, la charge des Coliformes trouvée peut être classée à la limite supérieure de l'acceptabilité ($< 10^4$) et elle en indique le potentiel de développement des problèmes de santé publique et des risques inacceptables (**CFS, 2014**).

En plus des Coliformes, un autre indicateur hygiénique représenté par les espèces de *Staphylococcus* était recherché et quantifié. La gélose BP additionnée de tellurite de potassium et de jaune d'œuf permet de visualiser l'aspect macroscopique typique des espèces de *Staphylococcus* (colonies noires entourées d'une zone claire opalescente). Par conséquent, les résultats touchant les $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$ UFC/g d'échantillon, ont été plus bas par rapport à la charge de $6.2 \cdot 10^5$ trouvée par **Bennani et al., (1995)**. Une présence basse s'explique par la tolérance de ces espèces au sel alimentaire (espèces halophiles), le fait que cette viande salée est de teneur en sel de 1.24 ± 0.65 %, ça d'une part, d'autre part, cette présence, est aussi, expliquée par la teneur réduite de l'eau, conséquente au séchage et salage, de ces morceaux de viande qui est de 5.94 ± 1.7 % qui permet une croissance, néanmoins ralentie. Il est à noter qu'un taux d'humidité de 10.38 ± 2.31 % a été

trouvé par **Bennani et al., (1995)**. L'augmentation du taux d'humidité conduit à des altérations et au sùrissement à cause du développement des bactéries lactiques ou des Coliformes (**Jay et al., 2008 ; Lonnecker et al., 2010 ; Guiraud, 2003**). La moyenne trouvée peut être classée à la limite supérieure de l'acceptabilité ($< 10^4$) et indique le potentiel de développement de problèmes de santé publique et de risques inacceptables. Il est à noter que plus de 10^5 sont nécessaires pour produire un niveau de toxine thermostable préformée de l'ordre de 1 μg , capable de provoquer une intoxication alimentaire (**CFS, 2014 ; Le Loir et al., 2003**).

En ce qui concerne les deux paramètres physicochimiques restants ; le pH et la matière sèche, ces paramètres ont enregistré, respectivement, des moyennes de l'ordre de 5.81 ± 0.12 et $94.04 \pm 1.7 \%$. Des taux de pH similaires ont été trouvés par **Boudechicha et al., (2017)** (6.04 ± 0.12) et **Bennani et al., (1995)** (5.32 ± 0.02). Les valeurs de pH qui varient entre 6 et 6.02, créent un environnement favorable pour la croissance des bactéries lactiques (**Durand, 2005**).

Les bactéries sulfito-réductrices, germes à indice hygiénique recherchés et énumérés sur gélose VF additionnée par l'alun de fer et le sulfite de sodium, sont de résultat parfois positif (présence notée par « 1 »), d'autres fois négatif (absence notée par « 0 »). La formation de colonies noires, suite à la réduction de sulfite en sulfure, traduit la présence de ce pathogène et évoque la présence du *Clostridium perfringens* fréquemment impliqué dans les maladies de type alimentaire. Les échantillons des viandes ont affiché une moyenne entre le 0 et le 1 de l'ordre de 0.23 ± 0.43 chez tous les échantillons à part quatre qui ont été négatifs. Un tel résultat corronne parfaitement avec celui trouvé par de nombreuses études (absence dans la quasi-totalité des échantillons) (**Boudechicha et al., 2017 ; Ferreira et al., 2007 ; Lizaso et al., 1999 ; Bennani et al., 1995**).

Le seul germe à indice sécuritaire, investigué dans cette recherche, est le dénombrement du genre *Salmonella*, qui a été recherché sur gélose *Hektoen*, gélose sélective utilisée pour l'isolement et la différenciation des agents pathogènes entériques, grâce l'inhibition des bactéries gram positif due à la présence des sels biliaires qui peuvent également inhiber, légèrement, la croissance d'autres Gram négatifs. Les résultats ont été pour tous les échantillons négatifs, normalement qualifiés d'au moins de 10 UFC/g lors des analyses microbiologiques. Ce résultat est confirmé par celui de

Boudechicha et al., 2017 et **Bennani et al., 1995**, absence pour tous les échantillons analysés. *Salmonella* et *Escherichia coli* sont les plus importants genres retrouvés dans la viande fraîche causant de maladies d'origine alimentaire (**Hernández-Aquino et al., 2020**).

Concernant les Levures et Moisissures, capables de croître, moins rapidement, en milieu acide et aux températures proches de froid positif, leur incubation prend plus de 4 jours à température de 22 °C. Leur dénombrement sur gélose OGA inhibe la croissance de la plupart des germes sensible à l'oxytétracycline. Les résultats ont été d'environ $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$ et $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$ UFC/g, respectivement, pour les Levures et Moisissures. Une moyenne inférieure par rapport à **Bennani et al., 1995** ayant trouvé pour les Levures un taux d'ordre de $6.3 \cdot 10^6$ UFC/g, mais en contrepartie, une moyenne proche par rapport à **Boudechicha et al., (2017)** ayant trouvé un taux de l'ordre de $< \log_{10}$ UFC/g, en comptant les deux, ensemble.

La recherche de la flore de bactéries lactiques sur gélose MRS, sélective pour le groupe «LLPW» (*Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Weissella*) et d'autres genres secondaires (*Lactococcus* et *Streptococcus*) (**Schillinger & Holzapfel, 2003 ; Reuter, 1985**). Cette recherche a été caractérisée par l'apparition des colonies le plus souvent de petites tailles dites punctiformes. Ce microcosme lactique protecteur (*Food microcosm protect*) psychotrope (25 °C, 3 jours d'incubation), sûr pour la consommation humaine, à reconnaissance du statut GRAS « *Generally Recognized As Safe* » (**Von Wright & Axelsson, 2012 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Castellano et al., 2008 ; Klaenhammer et al., 2005 ; Carr et al., 2002**), est présent dans tous les échantillons, et les résultats ont donné une moyenne de $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$ UFC/g, qui est assez proches du résultat de **Bennani et al., (1995)** ($4.2 \cdot 10^5$ UFC/g) et de **Boudechicha et al., 2017** ($4 \log$ UFC/g). Les bactéries lactiques ont été isolées à partir de divers produits carnés, depuis les années 1980 et 1990 (**Samelis et al., 1994 ; Schillinger & Lücke, 1987 ; Morishita & Shiromizu, 1986**) jusqu'aux années 2000 (**Al-Allaf et al., 2009 ; Najjari et al., 2008 ; Jones et al., 2008 ; Chaiyana et al., 2007 ; Bromberg et al., 2004 ; De Martinis et al., 2001**). Des valeurs, plus récentes, d'environ de 10^6 UFC/g, ont été signalées, selon le cas de l'étude, à partir de la viande fraîche bovine et/ou ovine (**Naimi & Khaled, 2014 ; Olaoye & Onilude, 2009 ; Najjari et al., 2008**).

Il est important de noter qu'un repiquage et conservation (à court et à long terme) de trois isolats pathogènes, après passage sur les trois tests d'orientation (gram, catalase et sporulation) ; (SK2) *Staphylococcus sp.* et (EK8) et (EK11) Entérobactéries, ont été réalisés pour un usage ultérieur, de même, un repiquage et conservation, après réalisation des trois tests d'orientation, ont été faits, pour certains isolats de bactéries lactiques.

En termes de cette discussion, les morceaux de viandes analysés, montrent une diversité de microorganismes à aspect hygiénique, à moins, les sulfito-réducteurs, et une absence de germes à aspect sécuritaire (Salmonelles). La présence de ces quantités de microorganismes est due à une contamination secondaire, notamment ; lors de la préparation (non-propreté des ustensiles et non-respect des règles des pratiques de préparation, défaut d'hygiène de personnel, etc.) ; et lors de la conservation de ces viandes. Mais aussi, du a l'activité de l'eau déduite par calcul (0.87 %), une telle mesure de la quantité d'eau libre ou disponible est propices pour la croissance de cette fraction des bactéries pathogènes et responsables de la détérioration. Cette activité et malgré l'ajout de sel utilisés pour la conservation, toute en la diminuant, en liant l'eau libre et en la rendant indisponible, mais elle n'a pas arrivé à la limite (< 0.85 %) de ne pas soutenir, totalement, leurs croissances.

Il est à noter qu'il est impossible, de conclure sur la qualité de ces derniers vis-à-vis les normes et les standards de qualité nationaux et internationaux (critères microbiologiques), qui en sont absents. Cela nécessite d'établir des normes et des standards de conformité. Cette recherche, peut venir alimenter la littérature en matière de charges microbiologiques et de détermination physicochimiques de la viande salée et séchée, afin d'élaborer, au moins, des standards nationaux, de qualité des produits naturels « bio ».

2.6 Conclusion

La présente partie avait pour objectif de mettre en évidence les germes composant le microbiote de la viande salée et séchée (*ready to eat meat*) préparée traditionnellement dans le Sud-ouest de l'Algérie. Les résultats ont montré la présence de : germes aérobies, Coliformes, Staphylocoques, Levures, Moisissures et bactéries lactiques, $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$, $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18$

10^3 , $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$, $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$ et $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$ et $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$ UFC/g ; l'absence (< 10 UFC/g) de Coliformes fécaux de Salmonelles et de bactéries sulfito-réductrices. Des valeurs de déterminations physicochimiques de l'ordre de ; 5.81 ± 0.12 , < 0.87 %, 10.38 ± 2.31 % et 1.24 ± 0.65 % pour le pH, l'humidité, a_w et la salinité, dans le même ordre.

Ces charges de microbiote et déterminations physicochimiques, constituent une contribution précieuse toutes en donnant une appréciation sur le niveau de qualité et de la sécurité de cette viande. Par la même occasion, elles alimentent la littérature, pour des futurs standards de qualité et même un processus de la labellisation des produits « bio », par ces valeurs trouvées. De même, elles incitent d'intensives recherches en tenant compte la nature de la viande, la région géographique et la technique de préparation et de conservation.

2.7 Références bibliographiques

- Aksu, M. I., & Kaya, M. (2005). Effect of storage temperatures and time on shelf- life of sliced and modified atmosphere packaged Pastirma, a dried meat product, produced from beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(8), 1305-1312
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2118>
- Alagić, D., Stojnović, M., Zdolec, N., Njari, B., Filipović, I., Kozačinski, L., ... & Vragović, N. (2011). Microbial characterization of horse meat dry sausage. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*, 13(6), 450-455.
- Ali, N. H., Farooqui, A., Khan, A., Khan, A. Y., & Kazmi, S. U. (2010). Microbial contamination of raw meat and its environment in retail shops in Karachi, Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(06), 382-388.
<https://doi.org/10.3855/jidc.599>
- Al-Allaf, M. A. H., Al-Rawi, A. M. M., & Al-Mola, A. T. (2009). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from minced beef meat against some pathogenic bacteria. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23(3).
- Bennani, L., Zenati, Y., Faid, M., & Ettayebi, M. (1995). Physico-chemical and microbiological characteristics of a dried salted meat product (Kaddid) in Morocco. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 201(6), 528-532.
<https://doi.org/10.1007/BF01201577>

- Boudechicha, H. R., Nasri, I., Bennaceur, Z., Sellama, M., Hafid, K., Boudjellal, A., & Gagaoua, M. (2017). Microbiological changes during the preparation steps of Khliaa Ezir: a traditional cured meat product of Algeria. <https://doi.org/10.15761/IFNM.1000199>
- Bourgeois, C. M., Mesclé, J. F., Zucca, J., & Larpent, J. P. (1988). Microbiologie alimentaire. v. 1: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires.
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C. L., Delboni, R. R., & Oliveira, J. D. (2004). Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2), 137-144. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100023>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 483-499. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.009>
- Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department. (2014). Microbiological guidelines for food (for ready-to-eat food in general and specific food items).
- Chaiyana, J., Boonrang, S., & Sinsuwongwat, S. (2007). Isolation and screening of bacteriocin producing bacteria from fermented meat products. *Biotechnology for gross national happiness*, 108, 245-258..
- Centre d'information des viandes. (2008). Bien manger, bien bouger... La viande dans l'alimentation des actifs. Brochure Informative.
- Coibion, L. (2008). *Acquisition des qualités organoleptiques de la viande bovine: adaptation à la demande du consommateur* (Doctoral dissertation).
- Daoudi, A., Frenzt, J. C., Martin, J. L., & Mekhtiche, L. (2006). Les produits charcutiers halal: Charcuterie et préparations bouchères. *Conflandey: MAE-ERTI*. p, 492.
- Dawood, A. A. (1995). Physical and sensory characteristics of Najdi-camel meat. *Meat science*, 39(1), 59-69. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(95\)80007-7](https://doi.org/10.1016/0309-1740(95)80007-7)
- De Martinis, E. C., Públio, M. R., Santarosa, P. R., & Freitas, F. Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 32-37. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100008>
- Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 349-356.

- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology*, 157(2), 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- Draganski, A. (2012). *U.S. Patent Application No. 13/184,177*.
- Durand, P. (2005). Technologie des produits de charcuterie et des salaisons. *Lavoisier –Tec & Doc*.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., ... & Teixeira, P. (2007). Chemical and microbiological characterization of "Salpicao de Vinhais" and "Chourica de Vinhais": Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food Microbiol*, 24, 618-623. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.12.007>
- Food and Agriculture Organisation. (2000). Abattage, découpe de la viande et traitement ulterieur. *FAO, Rome*. 23- 44.
- Food Safety Authority of Ireland. (2019). FSAI Guidance Note: Validation of Product Shelf-life. FSAI, Dublin. https://www.fsai.ie/publications_GN18_shelf-life/
- Gagaoua, M., & Boudechicha, H. R. (2018). Ethnic meat products of the North African and Mediterranean countries: an overview. *Journal of Ethnic Foods*, 5(2), 83-98. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2018.02.004>
- Garba, H., Kakalo, S. (1996). Contribution à l'étude des procédés traditionnels de fabrication du *kilichi* au Niger. *Mémoire de fin d'études. Université Abdou moumouni de Niamey*. 40 p.
- Guiraud, J. P. (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. Pp: 136-139.
- Heikal, H. A., El-Dashlouty, M. S., & Saied, S. Z. (1973). Biochemical, histological and technological changes occurring during the production of sausage from camel meat and beans. *Agricultural research review*.
- Heinz, G., & Hautzinger, P. (2009). *Meat processing technology for small to medium scale producers*. FAO.
- HERNÁNDEZ-AQUINO, S. A. Ú. L., SIMÁN, E. D. J. M., MIRANDA-ROMERO, L. A., & ZUÑIGA, B. A. (2020). Meat Native Lactic Acid Bacteria Capable to Inhibit Salmonella sp. and Escherichia coli. *Biocontrol Science*, 25(2), 107-112. <https://doi.org/10.4265/bio.25.107>
- Ho, T. N. T. (2008). *Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit* (Doctoral dissertation, Bordeaux 1)..

- Igene, J. O., Farouk, M. M., & Akanbi, C. T. (1990). Preliminary studies on the traditional processing of Kilishi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50(1), 89-98. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740500110>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Journal Officiel de la république algérienne N°65 du 5 décembre 2012 : Arrêté du 25 Rajab 1432 correspondant au 27 juin 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en eau et en matières volatiles des corps gras d'origine animale et végétale.
- Jones, M., Arnaud, E., Gouws, P., & Hoffman, L. C. (2017). Processing of South African biltong-A review. *South African journal of animal science*, 47(6), 743-757. <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i6.2>
- Jones, R. J., Hussein, H. M., Zagorec, M., Brightwell, G., & Tagg, J. R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, 25(2), 228-234. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.11.001>
- Kalilou, S. (1997). *Transformation traditionnelle de la viande en kilishi au Niger: Optimisation du procédé* (Doctoral dissertation, École nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires (Massy, Essonne)).
- Kameník, J. (2013). The microbiology of meat spoilage: a review. *Maso International—Journal of Food Science and Technology*.—2013.—P, 1-9.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 393-409. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.007>
- LABADIE, J. (2006). Les ecosystèmes microbiens dans les produits carnes. *Viandes et produits carnés (Aubière)*, 147-152. Laurent c. Conservation des produits d'origine animale en pays chauds. *ACCT Paris*. 1981.
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2(1), 63-76.
- Lizaso, G., Chasco, J., & Beriain, M. J. (1999). Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiology*, 16(3), 219-228. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0238>
- Lonnecker, S. M., Boyle, E. A., Getty, K. J., Buege, D. R., Ingham, S. C., Searls, G. I. N. A., & Harper, N. M. (2010). Production methods and product characteristics of jerky produced by small and very small meat processing businesses. *Journal of Muscle Foods*, 21(4), 826-833. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2010.00222.x>

- Maas-van Berkel, B., Van den Boogaard, B., & Heijnen, C. (2005). *La conservation du poisson et de la viande*. Agromisa Foundation.
- Morisetti, M. D. (1971). Public health aspects of food processing. *Process Biochemistry*, 6(6), 21-+.
- Morishita, Y., & Shiromizu, K. (1986). Characterization of lactobacilli isolated from meats and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 3(1), 19-29. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(86\)90037-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(86)90037-1)
- Naidoo, K., & Lindsay, D. (2010). Survival of *Listeria monocytogenes*, and enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pasteurii*, during two types of biltong-manufacturing processes. *Food Control*, 21(7), 1042-1050. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.025>
- Naimi, M., & Khaled, M. B. (2014). Isolation and Phenotypic Characterization of *Lactobacillus Sakei* and *Pediococcus* spp. Antagonists from Algerian Meat. *Global journal of science frontier research: C Biological Science*, 14(5), 21-25.
- Naimi, M., & Khaled, M. B. (2011). Isolement et screening des lactiques bactériocinogènes antagonistes de microorganismes pathogènes et d'altération pour la bioconservation de la viande. Thèse de Magister en Microbiologie appliquée et moléculaire, Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes.
- Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A., & Zagorec, M. (2008). Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *International journal of food microbiology*, 121(3), 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.045>
- Nummer BA, Harrison JA, Harrison MA, et al. Effects of preparation methods on the microbiological safety of home-dried meat jerky. *Journal of Food Protection*. 2004; 67 (10) : 2337- 2341.
- Norme algérienne. NA 12.96.02., Méthode d'analyse. Viande et produits à base de viande. Mesure de PH. (Méthode de référence).
- Norme internationale ISO 6888-1. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 1: technique utilisant la gélose Baird- Parker.
- Norme Internationale. ISO 13681., méthode d'analyse : viandes et produits à base de viande, dénombrement des levures et moisissures, technique par comptage des colonies.
- Norme nationale. NA 1203 / ISO 6579., microbiologie des aliments, méthodes horizontales pour la recherche des *salmonella spp.*
- Norme nationale. NA 1903 / NFV 04-503. Viandes et produits à base de viande. Dénombrement des bactéries lactiques, référence de la technique.
- Norme nationale. NA 1903., viandes et produits à base de viande, dénombrement des bactéries lactiques.

- Norme nationale. NA 644, CACQE 12.96.00., méthode d'analyse: viandes et produits à base de viande, échantillonnage et préparation des échantillons pour essai, prélèvement élémentaire.
- Norme nationale. NA 6803/ ISO 4832., microbiologie des aliments, méthodes horizontales pour le dénombrement des coliformes.
- Norme nationale. NA 15176., microbiologie des aliments, méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.
- Norme nationale. NA, CACQE 12.95.52., Viande et produits à base de viande. Dénombrement des micro-organismes, méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C.
- Norme nationale. NA, CACQE 12.97.73., méthode d'analyse: denrées animales ou d'origine animale, méthodes générales d'analyse bactériologique.
- Norme., Méthode d'analyse. Dosage des Chlorures (Méthode de Mohr).
- No, G. N. (2017). 18, Validation of product shelf-life, Revision 3. *Food Safety Authority of Ireland*.
- Olaoye, O. A., & Onilude, A. A. (2009). A study on isolation of presumptive technologically important microorganisms from Nigerian beef. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(1), 75-83.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat science*, 73(2), 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.019>
- Office vétérinaire fédéral. (2006). Directives techniques relatives à l'analyse microbiologique des viandes.
- Pearson, AM., Gillett, TA. (1999). *Processed Meats*. Aspen Publishers Inc, Gaithersburg, Maryland.
- Pérez-Rodríguez, F., Castro, R., Posada-Izquierdo, G. D., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2010). Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Science*, 86(2), 479-485. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.038>
- Petit, T., Caro, Y., Petit, A. S., Santchurn, S. J., & Collignan, A. (2014). Physicochemical and microbiological characteristics of biltong, a traditional salted dried meat of South Africa. *Meat science*, 96(3), 1313-1317. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.003>
- Unnevehr, L. (Ed.). (2003). *Food safety in food security and food trade* (Vol. 10). Washington, DC: International Food Policy Research Institute.

- Reardon, T., Codron, J. M., Busch, L., Bingen, J., & Harris, C. (2001). Global changes in agrifood grades and standards: agribusiness strategic responses in developing countries. *International Food and Agribusiness Management Review*, 2 (3-4): 421-435.
- Reuter, G. (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2(1-2), 55-68. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90057-1)
- Ross, T., & Dalgaard, P. (2004). Secondary models. Modeling microbial responses in food, 17, 360. <https://doi.org/10.1201/9780203503942.ch3>
- Samelis, J., Maurogenakis, F., & Metaxopoulos, J. (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*, 23(2), 179-196. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90051-5)
- Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2003). Culture media for lactic acid bacteria. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 37, pp. 127-140). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80011-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80011-5)
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiology*, 4(3), 199-208. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(87\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0740-0020(87)90002-5)
- Sloan, A. E. (2015). The top ten food trends. *Food Technology*, 69(4), 24+..
- Steinhäuserová, I., Svobodová, I., Bořilová, G., & Hulánková, R. (2012). The effect of maintaining the cold chain on the shelf life of poultry products. *Maso International*, 1, 49-54.
- Thayer, D. W. (2001). Development of irradiated shelf-stable meat and poultry products. *Food Irradiation: Principles and Applications*, 13, 329-345.
- Vieira, L. M. (2006). The role of food standards in international trade: assessing the Brazilian beef chain. *BAR-Brazilian Administration Review*, 3(1), 17-30. <https://doi.org/10.1590/S1807-76922006000100003>
- Vindevogel, H. (2000). Cours hygiène et inspection des denrées alimentaires. *Faculty of Veterinary Med. ULg. Belgium*.
- Von Wright, A., & Axelsson, L. (2012). Lactic acid bacteria: an introduction. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*, 4, 1-16. <https://doi.org/10.1201/b11503-2>
- Warfield, B., & Tume, L. (2000). Marketing analysis and plan for the camel industry. *Rural Industries Research and Development Corporation: Canberra*.

- **Y**acouba, I. (2009). Analyse des techniques traditionnelles de transformation de la viande en Kilichi dans la commune urbaine de Madaoua (Rép. du Niger). *Mémoire d'ingénieur, Institut Polytechnique Rural de Formation et de Recherche Appliquée (IPR/IFRA)*, 200.
- Yetim, H., Cankaya, H. (2001). The effects of CaCl₂ and curing technique on the tenderness of Pastirma, a Turkish dry meat product. *Gida*. (26) : 203-207.
- **Z**agorec, M., Champomier-Verges, M. C., Renault, P., Valence-Bertel, F., Le Loir, Y., & Montel, M. C. (2012). Ecosystèmes microbiens et préservation des aliments. (24) 2012; *CIAG: Carrefour de l'innovation agronomique-alimentation, Toulouse, FRA, 2012-11-28-, 57-77*.
- Zukál, E., Incze, K. (2010). Drying. In: Toldrá F, eds, *Handbook of meat processing*. Ames, Iowa: *Blackwell Publishing*; (566): 219–229.

Chapitre 3

Recherche de l'activité antibactérienne et identification phénétique du microbiote lactiques de *Guedid*

3.1	Résumé	36
3.2	Introduction	37
3.3	Matériel et méthodes	54
3.4	Résultats	63
3.5	Discussion	76
3.6	Conclusion	84
3.7	Références bibliographiques	85

3.1 Résumé

La seconde partie du présent travail était menée dans le but de sélectionner des isolats lactiques à forte activité antibactérienne et de les identifier phénétiquement. (157) isolats à gram positif, catalase et sporulation négatives, ont exhibé une activité antibactérienne de l'ordre de 10 à 30 mm sur géloses (MRS et TSA-T), notamment contre *Bacillus cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Cl. perfringens* CECT 486. La sensibilité aux températures et aux enzymes, la lysogénie ainsi que la quantification des bactériocines ont été aussi réalisées. A cet effet, (49) isolats surmontant l'épreuve et montrant un fort potentiel antibactérien, ont été examinés par approche phénétique numérique (CO₂ ; croissance aux T°, NaCl, et de pH ; hydrolyse de l'arginine et l'esculine ; H₂S et mobilité ; nitrates, urée et fermentation des sucres) ont permis leur affiliation ainsi aux genres : *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Weisella* et *Tetragenococcus* avec des IDs et test de probabilité de bons à excellents. Ces isolats, grâce à leurs propriétés inhibitrices performantes pourraient être considérés comme des bio compléments alimentaires ou médicaux à des fins préventives ou curatives de nombreux désordres métaboliques et gastro-intestinaux.

Mot clés : bactéries lactiques, identification, antibactérien, bio compléments.

3.2 Introduction

Les bactéries lactiques, des anciens microorganismes unicellulaires procaryotes, dont les ancêtres datent d'environ trois milliards d'années dans l'histoire, même avant les Cyanobactéries photosynthétiques. Elles existaient dans les sédiments même avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ; une raison qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Quiberoni *et al.*, 2001). Ces bactéries ont été aveuglement exploitées il y a plus de 4000 ans dans la fermentation et la conservation traditionnelles et naturelles des aliments à l'instar du lait, la viande, les fruits et légumes, et les boissons (Drider & Prevost, 2009). Leur premier isolement remonte à l'époque de grandes découvertes de la microbiologie au début du 20^{ème} siècle conséquemment à la suggestion de Elie Metchnikoff qui a établi le lien entre la longévité et la bonne santé des paysans bulgares et la consommation de produits laitiers fermentés dues à la présence de certains microorganismes pouvant conférer des effets bénéfiques sur la santé humaine (Samot, 2012). D'ailleurs, la dénomination bactéries lactiques n'a été introduite et acceptée qu'au début de cette ère pour qualifier un groupe de genres dont le trait commun est la production de l'acide lactique comme métabolite essentiel de la fermentation de glucides chez les bactéries homofermentaires, et de l'éthanol et CO₂ en plus chez les bactéries hétérofermentaires. Cette dernière appellation a, dès lors, perpétué et dominé d'autres comme ; bactéries acidifiantes du lait, bactéries produisant de l'acide lactique ou souvent les lactiques (*lactics*) (Leonard, 2013 ; Carr *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquistes largement répandus dans la nature et trouvées dans différentes niches écologiques (Mechai, 2014 ; Von Wright & Axelsson, 2012). Elles sont généralement associées à des habitats riches en nutriments, tels que divers produits alimentaires (lait et dérivés, viande et dérivés, fruits et légumes, etc.), mais aussi, font partie de la flore commensale des muqueuses et des cavités naturelles des mammifères où elles vivent dans un écosystème bactérien. Dans le tractus gastro-intestinal sont essentiellement présents les genres lactiques : *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weissella* ; alors que dans le vagin sont surtout trouvées des espèces affiliées au genre *Lactobacillus* y apportant une protection contre les pathogènes (*Trichomonas vaginalis* et *Candida albicans*) en acidifiant le milieu. Ces bactéries sont

aussi présentes dans la sphère ORL et à l'état libre dans l'environnement ou associées aux plantes (maïs, orge, olives, ensilage, etc.) (Leonard, 2013 ; Ruiz *et al.*, 2009 ; Carr *et al.*, 2002).

Depuis la monographie d'Orla-Jensen, (1919), à propos des bactéries lactiques, la clé d'identification a été toujours conservée selon les traits de base qu'ils ont utilisés pour la classification phénotypique (Tableau 3.1). Ces traits comprennent : la morphologie, la formation de tétrades, le type fermenteur (production de CO₂), la croissance à différentes conditions hostiles (de températures, de pH acides et alcalins et de concentrations en sel), le type de l'isomère de l'acide lactique produit (D et/ou L), l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétoïne et le profil d'utilisation des sucres à partir de divers glucides fermentescibles étudiés à l'aide de galeries classiques ou miniaturisées comme l'API50 CH (Tableau 3.2) (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Carr *et al.*, 2002 ; Corsetti *et al.*, 2001 ; Orla-Jensen, 1919). D'autres caractères utiles, tels que la composition de la paroi, le type d'acides gras et la mobilité sont considérés importants dans la classification phénétique (Pilar *et al.*, 2008 ; De Ambrosini *et al.*, 1996 ; Gilarová *et al.*, 1994). S'ajoute à cela, le type de l'acide aminé du mucopeptide, la présence et le type de l'acide teichoïque/menaquinones, ainsi que les LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Tahiri, 2004 ; Stiles *et al.*, 1997). L'électrophorèse des protéines cellulaires totales est l'une des techniques simples à réaliser en conditions natives ou dénaturantes, qui sépare les protéines cellulaires selon leur charge ou leur poids moléculaire permettant ainsi l'obtention des profils électrophorétiques qui peuvent être ensuite stockés dans des bases de données (Coeuret *et al.*, 2003). Toutefois, ces caractéristiques phénotypiques restent utiles comme point de départ mais restreintes pour une identification fiable avec la description croissante de nouveaux genres et espèces (Von Wright & Axelsson, 2012).

Sur la base de la clé d'Orla-Jensen, (1919), les bactéries lactiques ont été divisées en sept majeurs groupes (anciens genres) où les bacilles ont été répartis en quatre groupes ; *Betabacterium*, *Sterptobacterium* et *Thermobacterium* métabolisant le glucose par voie hétéromofermentaire (*Lactobacillus* et *Carnobacterium* ; *Lactococcus* et *Weissella*) et *Microbacterium* homofermentaire (*Brochothrix*). Cependant les cocci ont été classés en trois groupes ; *Betacoccus* et *Streptococcus* hétéromofermentaires (*Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* ; *Streptococcus*, *Enterococcus* et

Vagococcus) et *Tetracoccus* homofermentaire (*Pediococcus* et *Tetragenococcus* (Tableau 3.1). Sur la base de la clé de Von Wright & Axelsson, (2012), ces anciens genres ont été actualisés pour garder les noms des genres d'usage en cours (Tableau 3.2).

Tableau 3.1 : Clés de différenciation des bactéries lactiques (Orla-Jensen, 1919)

Genres	Forme	Catalase	Réduction NO ₂	Fermentation	Genre actuel
<i>Betabacterium</i>	Bacilles			Hétéro-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i> <i>Sterptobacterium</i>	Bacilles	-		Homo- Homo-	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i> <i>Lactococcus</i>
<i>Sterptococcus</i>	Coccis	-		Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Coccis		-	Hétéro-	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i> <i>Tetracoccus</i>	Bacilles Coccis	+ +	+ +	Homo- Homo-	<i>Brochothrix</i> <i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

Une autre classification a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes selon la nature des produits du métabolisme bactérien des glucides : (1) le groupe I contient majoritairement des Lactobacilles homofermentaires ; (2) le groupe II renferme les bactéries hétérofermentaires et comprend les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces du genre *Lactobacillus* ; (3) Quant au groupe III, il regroupe quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce dernier genre renferme des espèces capables d'être homo ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales occupant ainsi une position intermédiaire entre les groupes I et II (McLeod *et al.*, 2008).

Récemment, des approches moléculaires et génétiques, ayant l'avantage de ne pas être influencées par les conditions de culture, sont consultées pour une identification précise, concise et rapide permettent une meilleure différenciation de ce groupe de genre à différents taxins, allant du genre jusqu'à la souche. Parmi ces approches, les plus en vogue font référence à la 16S-ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Aussi, le ratio (G+C en mol %), la PCR, la RAPD (*Related PCR-based methods including random Amplification of Polymorphic ADN*), et l'hybridisation ADN-ADN (Dušková *et al.*, 2012 ; Buddhiman *et al.*, 2008 ; Schleifer & Ludwig, 1995), la MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) (Šedo *et al.*, 2011 ; Fenselau & Demirev, 2001). D'autres techniques sont aussi utilisées à l'instar du ribotypage, le polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP), l'analyse de restriction enzymatique (REA), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP), le profil plasmidique (PP) et l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) (Felis & Dellaglio, 2015 ; Saito *et al.*, 2011 ; Singh *et al.*, 2009). Par conséquent, ces techniques, entre autres, ont conduit à dessiner la position systématique des bactéries lactiques couvrant six (6) familles et trente-trois (33) genres, à la lumière de la classification du *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, dans sa seconde édition, volume 3 ; gram+ pauvres en G+C% comme ci-après : Phylum : *Firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Lactobacillales*, Familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* et en douze (12) principaux genres utilisés en technologie alimentaire : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Figures 3.1 et 3.2) (Vos *et al.*, 2011 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Drider & Privost, 2009). Pour le genre *Bifidobacterium*, il est phylogénétiquement éloigné des bactéries lactiques, il appartient au phylum *Actinobacteria* (Trias, 2008).

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de bactéries présentant des similitudes morphologiques, métaboliques et physiologiques. Comme description générale, ce sont des cocci, bacilles, coccobacilles, à ratio de G+C dessous de 50 %, gram positives, asporulantes, anaérobies aérotoérantes, généralement mésophiles (certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes) et non mobiles, négatives aux cytochrome oxydase, catalase et benzidine, nitrates, nitrite, gélatinase lactate, ne produisant ni indole ni hydrogène sulfureux (H₂S) (Von Wright &

Axelsson, 2012 ; Michaela *et al.*, 2009 ; Carr *et al.*, 2002). De prime à bord, les bactéries lactiques se divisent en deux groupes : les bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et les cocci (les autres genres) (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Doyle *et al.*, 2006 ; Carr *et al.*, 2002). La différenciation sur la base des critères phénétiques, citée en haut, a pu faire apparaître un groupe noyau composé de quatre (4) genres : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. D'autres révisions taxinomiques ont proposé de nombreux nouveaux genres : *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Jin *et al.*, 2009). Il est lieu de noter que les bactéries lactiques sont génétiquement aptes de mener un métabolisme respiratoire (cytochrome-C oxydase positives), mais cela n'est pratiquement possible qu'en présence, dans le milieu, de l'hème comme cofacteur et elles possèdent la faculté de survivre face à des quantités d'oxygène de l'air et ses sous-produits (comme l'H₂O₂) grâce aux peroxydases. Certaines espèces expriment une activité du catalase positive qualifiée comme pseudo-catalase (Lechardeur *et al.*, 2011 ; Michaela *et al.*, 2009 ; Carr *et al.*, 2002), la raison pour laquelle, en l'occurrence des bactéries lactiques, le test du cytochrome-C oxydase peut être un caractère plus fiable que le test de catalase couramment utilisé (Klaenhammer, 1988).

Les bactéries lactiques jouissent d'une capacité métabolique très diverse leur permettant de s'adapter à une variété de conditions. Comme elles n'utilisent pas d'oxygène dans leur production d'énergie, elles sont hétérotrophes et chimioorganotrophes et tirent l'énergie nécessaire à partir de l'oxydation des monosaccharides (glucose, galactose, pentoses : xylose, ribose, arabinose, hexitols, etc.), les disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose, etc.) et les pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol, etc.) par voie homofermentaire ou hétérofermentaire dans les conditions anaéro-aérotolérances ce qui les divise en deux groupe biochimique, selon les produits finaux de la fermentation (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Michaela *et al.*, 2009 ; Carr *et al.*, 2002 ; Bourgeois, 1996).

Tableau 3.2 : Clé de différenciation des bactéries lactiques (genres communs et caractéristiques différentielles) (Von Wright & Axelsson, 2012)

Familles	Genres	Caractéristiques								Isomère de l'acide lactique
		Forme	CO ₂ à partir du glucose	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6.5% NaCl	Croissance à 18% NaCl	Croissance à pH 4.4	Croissance à pH 9.6	
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Coccus (tétrades)	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacille	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Coccus	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragonococcus</i>	Coccus (tétrades)	-	+	-	+	+	- Variable	+	L
	<i>Vagococcus</i>	Coccus	-	+	-	-	-	Variable	-	L
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Coccus (tétrades)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Coccus	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>	Coccus	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Weissella</i>	Coccus ^a	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> ^b	Coccus	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>	Coccus	-	-	Variable	-	-	-	-	L

ND : non déterminé.

^a certains souches de *Weissella* sont de forme bacille.

^b Littératures plus ancienne, les Lactocoques sont appelés Streptocoques du groupe N

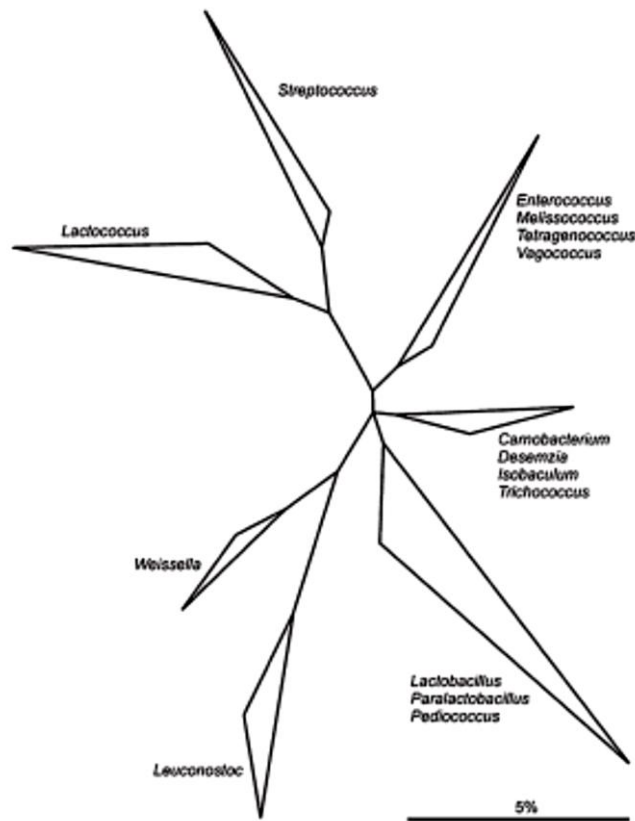


Figure 3.1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (barre indique une divergence de séquence estimée de 5%) (Vos *et al.*, 2009)

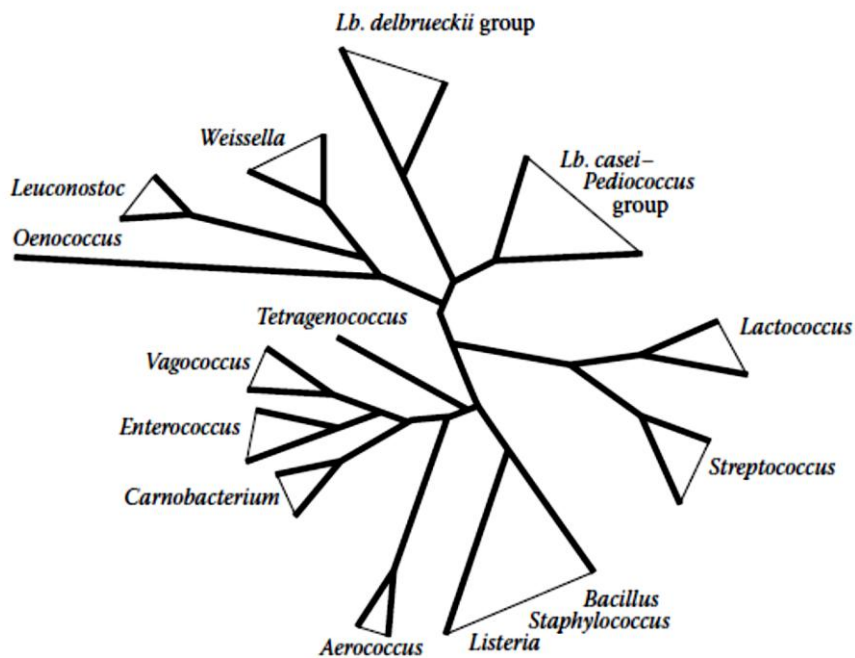


Figure 3.2 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et certains *Firmicutes* aérobies et facultative anaérobies (distances évolutives approximatives) (Von Wright & Axelsson, 2012)

Les lactiques homofermentaires produisent de l'acide lactique exclusivement (homolactiques strictes), ou bien en plus de l'acide acétique (hétérolactiques facultatives). Tandis que les lactiques hétérofermentaires, produisent l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂ (hétérolactiques strictes). Les lactiques homofermentaires comprennent les genres : *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*. Les lactiques hétérofermentaires sont composés des genres : *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et un sous-groupe du genre *Lactobacillus* (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Doyle *et al.*, 2006 ; Carr *et al.*, 2002). Les Leuconostocs et les Lactobacilles hétérofermentaires produisent autant d'acide acétique que d'acide lactique (Kandler, 1983). Les homofermentaires possèdent l'enzyme aldolase et sont capables de fermenter le glucose (glycolyse par voie d'Embden-Meyerhof Parnas) plus directement en acide lactique que les hétérofermentaires qui utilisent la voie alternative du pentose monophosphate (voie du 6 phosphogluconate/phosphoketolase), convertissant les hexoses en pentoses par l'enzyme phosphocétolase en produisant l'éthanol, l'acétate et le CO₂ en plus de l'acide lactique. Par ailleurs, le métabolisme des bactéries du genre *Bifidobacterium* a une voie particulière appelée voie fermentaire bifide ou voie de la fructose-6- phosphocétolase (FPC) (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Doyle *et al.*, 2006 ; Carr *et al.*, 2002 ; Orla-Jensen, 1919).

Selon la nécessité d'isoler un genre lactique particulier à partir d'un mélange de microorganismes ou de maintenir les isolats lactiques en culture (à court et à long terme), une armada de milieux de culture riches et complexes à base d'extraits de levure ou de viande et des peptones animales, ont été listés dans la littérature scientifique servant de milieux d'enrichissement, non sélectifs (électifs) et sélectifs pour toucher la grande fourchette d'hétérogénéité métabolique polyauxotrophique (sources de carbone, d'azote, d'énergie, sels minéraux et facteurs de croissance) (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Carr *et al.*, 2002 ; Reuter, 1985). Les préparations les plus couramment utilisées sont : l'eau peptonée et/ou le tampon phosphate utilisés comme bouillons d'enrichissement non sélectifs. La gélose APT (*All-Purpose Tween*) est souvent utilisée pour le genre *Lactobacillus*, alors la gélose MRS est acceptée comme milieu polyvalent en raison de sa capacité de satisfaire une variété de bactéries lactiques, notamment, le groupe de genres « LLPW » (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella*) et d'autres genres secondaires, du groupe « LS » (*Lactococcus* et *Streptococcus*). Ainsi, le MRS peut être utilisé comme milieu de culture de base pour

effectuer la quasi-totalité des tests physiologiques et biochimiques. La gélose HHD (*Homofermentative Heterofermentative differentiation*) est recommandée pour la différenciation au niveau du type fermentaire et du type d'isomère d'acide lactique produit. La gélose SL (*acetate medium*) est utilisée pour les Lactobacilli pour les différencier des *Carnobacteria* (*Lactobacillus like* appelés *atypical meat lactics*) étiquetés par une incapacité à croître sur cette gélose. La gélose M17, est utilisée comme milieu de culture de base pour isoler les Streptocoques. Il est à souligner, que le caractère sélectif est assuré par des modifications au niveau du pH, l'ajout d'agents inhibiteurs à des concentrations faibles, la variation du rapport temps/température d'incubation, en plus de quelques indicateurs de couleur (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Schillinger *et al.*, 2003 ; Carr *et al.*, 2002 ; Stiles *et al.*, 1997 ; Reuter, 1985). Le maintien des bactéries lactiques pour préparer une collection de cultures et pour assurer une disponibilité des souches viables et à l'identique fait appel à l'usage de deux techniques : (1) maintien à court terme et à des températures de réfrigération pour des travaux de routine au laboratoire (usage quotidien ou hebdomadaire) en utilisant des milieux de culture riches tels que le bouillon MRS, LAPTg, M17, Elliker, lait écrémé (NFM : *Non fat milk powder*) ; (2) maintien à long terme par congélation (utilisant les mêmes milieux auxquels un agent cryoprotecteur est additionné) ou par lyophilisation, ou encore sous azote liquide (De valdez, 2001).

Les genres lactiques exploités en technologie alimentaire sont sûrs pour la consommation humaine ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut *GRAS* (Dortu & Thonart, 2009 ; Castellano *et al.*, 2008 ; Klaenhammer *et al.*, 2005). Ils doivent répondre à certains critères à savoir : (i) l'absence de pathogénicité ou activité toxique, (ii) la capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, (iii) la capacité de dominance, (iv) la facilité de culture et de maintien à court et à long terme et (v) et le maintien des propriétés désirables (Ababsa, 2012). De plus, ces genres ne doivent pas conférer des gènes de résistance aux antibiotiques à des agents pathogènes potentiels par transfert horizontal de gènes (Mokoena, 2017). Ils peuvent aussi être utilisés sous une des quatre catégories réglementées par la FDA (*Food and Drug Administration*) : (1) médicaments ou produits biologiques, (2) compléments alimentaires (3) nourritures ou ingrédients alimentaires et (4) nourritures médicales (Mduduzi, 2017 ; Yerlikaya, 2014). Ainsi, les cultures bioprotectrices sont utilisées comme des agents bio-préservants afin de maintenir la stabilité, la sécurité et même de

prolonger la durée de vie microbiologique des denrées alimentaires, sans recourir aux additifs chimiques et cela grâce à leurs propriétés inhibitrices (da Costa *et al.*, 2019 ; Pratush *et al.*, 2012). Ces dernières s'expliquent par la compétition pour les nutriments, le changement des paramètres physicochimiques du milieu, tels qu'une acidification et une production de métabolites antimicrobiens (Tahiri, 2007). En addition, les culture starter fonctionnelles (cultures de départ) jouent un rôle majeur dans les procédés de transformation et de fermentation afin de développer certaines caractéristiques organoleptiques grâce à leur pouvoir aromatisant et texturant, tout en inhibant la croissance des bactéries pathogènes et des champignons réduisant ainsi la vitesse de détérioration des viandes, des légumes, et des produits laitiers (Hassan & Bullerman 2008 ; Carr *et al.*, 2002 ; Matilla-Sandholm *et al.*, 1999). En sus, les cultures probiotiques douées de un ou plusieurs mécanismes (modulation du microbiote intestinal, blocage des sites d'adhésion des pathogènes, modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et la compétition aux nutriments) confèrent des effets thérapeutiques et prophylactiques bénéfiques telles que ; traitement des désordres intestinaux sévères (diarrhées associées aux antibiotiques, maladie de l'intestin irritable, cancer du côlon), la gestion de l'intolérance au lactose, les allergies aux aliments, ainsi que le contrôle de diverses infections microbiennes (Rijkers *et al.*, 2010 ; De Champs *et al.*, 2003 ; Vizioli *et al.*, 2002 ; Carr *et al.*, 2002). Les cultures probiotiques peuvent être incorporées avec les peptides antimicrobiens pour augmenter le spectre d'action inhibitrice sur les agents pathogènes (Tomás *et al.*, 2010). Néanmoins, certains bactéries lactiques sont généralement associées à des aliments, et ont été incriminées dans des maladies de type alimentaire (Carr *et al.*, 2002), et quelques espèces du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et certains *Lactobacilli* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (König & Fröhlich, 2009 ; Charlier *et al.*, 2009 ; Aguirre & Collins, 1993).

Les bactéries lactiques produisent une gamme de métabolites à effet antimicrobien entravant la croissance ou détruisant les bactéries concurrentes comprenant essentiellement les acides organiques (acide lactique, acide acétique), le H₂O₂, le CO₂, la reutérine, le diacétyle, les acides gras, l'acétaldéhyde, ainsi que d'autres substances de nature protéique (les bactériocines et les *bacteriocines-like substances*). Ces métabolites suscitent l'intérêt de la filière agro-alimentaire pour améliorer la stabilité et la sécurité et la conservation naturellement « bio » des aliments (Mokoena, 2017 ; Gyawali & Ibrahim, 2014 ; Dortu & Thonart, 2009).

L'acide lactique, avec d'autres acides comme l'acide acétique, ont un effet antimicrobien sous leur forme dissociée ou non dissociée. Elles agissent au niveau de la membrane cytoplasmique perturbant le maintien du potentiel membranaire en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (abaissement du pH interne et libération de protons) (Alakomi *et al.*, 2000 ; Booth, 1985). L'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique (Blom *et al.*, 1991). A pH bas, une grande quantité d'acide lactique est sous la forme non dissociée, et elle est toxique pour nombreuses bactéries, champignons et Levures (Ammor *et al.*, 2007 ; Podolak *et al.*, 1996). De plus, il est à savoir que l'isomère (L+) est plus inhibiteur que son homologue (D-). L'isomère (D-) n'est pas hydrolysé par la lactate déshydrogénase humaine et peut provoquer des problèmes de santé, la raison pour laquelle, seuls les isolats produisant principalement l'isomère (L+) doivent être sélectionnés (Ammor *et al.*, 2007).

Le H₂O₂, produit en présence d'oxygène, s'accumule en l'absence de catalase. Son effet antimicrobien fait référence à l'oxydation des lipides membranaires et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires et la libération des acides nucléiques. Comme, il peut être lié à l'oxydation des groupements sulf-hydriles des enzymes cellulaires conduisant à une dénaturation et une perte de l'activité enzymatique, en plus, comme il est le précurseur principal des groupements superoxydes (O⁻²) et des groupements hydroxyle (OH), la présence du H₂O₂ cause des dommages à l'ADN bactérien (Ammor *et al.*, 2006).

Le diacétyl peut être synthétisé par le métabolisme du citrate de plusieurs bactéries des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Ce composé à effet antimicrobien affecte la croissance bactérienne en agissant sur l'utilisation de l'arginine par les bactéries de type de paroi gram négatif (Jay, 1982).

Le CO₂ est l'un des produits du métabolisme caractérisant les bactéries lactiques hétérofermentaires. L'accumulation du CO₂ dans le milieu occasionne un environnement anaérobie qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies stricts et provoque le dysfonctionnement des lipides et de la perméabilité membranaire et conduit ainsi à la décarboxylation des enzymes cellulaires des bactéries cibles (Ammor *et al.*, 2006).

Les acides gras insaturés issus de l'action lipolytique de certaines bactéries lactiques présentent une activité contre les bactéries de type de paroi gram positif et contre les champignons (Schnurer & Magnusson, 2005 ; Yang, 2000). L'acétaldéhyde, produit à partir du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques, a un effet antimicrobien à la concentration de 10 à 100 ppm contre *St. aureus*, de *Sa. Typhimurium* et d'*E. coli* (Piard & Desmazeaud, 1991 ; Devoyod & Poullain, 1987).

La Reutéline, dénommée aussi b-hydroxypropionaldehyde ou 3-hydroxypropionaldehyde, est synthétisée à partir du glycérol lors de la fermentation anaérobie par un nombre de souches de *Lb. reuteri* exerçant un vaste spectre antimicrobien contre les bactéries d'altération et pathogènes de type de paroi gram positif (*St. aureus*, *L. monocytogenes*, etc.) et gram négatif (*E. coli*, *Sa. Typhimurium*, etc.). Cette molécule thermostable qui exhibe une grande hydrosolubilité, une résistance aux enzymes protéolytiques et lipolytiques et une tolérance aux pHs, ce qui conduit à la qualifier comme agent d'utilisation thérapeutique et biopréservateur des produits alimentaires (Gyawali & Ibrahim, 2014 ; Arques *et al.*, 2011 ; Vollenweider, 2004 ; Vollenweider *et al.*, 2003). Elle interfère avec la réplication de l'ADN chez les procaryotes (gram positif ou gram négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Le mécanisme d'action de ce métabolite n'est pas encore bien élucidé, néanmoins, l'étude de Langa *et al.*, (2013) reporte que l'aldéhyde dérivant de la reutéline est bioactif grâce au stress oxydatif dû à la modification des groupes thiols des protéines et des petites molécules.

Le terme bactériocine a évolué au fil du temps. Il a été utilisé au départ pour qualifier des substances d'origine bactérienne possédant un élément protéique actif, un mode d'action bactéricide, et un spectre d'inhibition étroit (Tagg *et al.*, 1976). Ensuite, et bien que la première description reste limitante, la définition la plus largement acceptée reste celle les qualifiant comme des protéines ou de complexes de protéines extracellulaires, de faible poids moléculaire, produites par voie ribosomale par les bactéries de type de paroi gram positif, essentiellement les bactéries lactiques, mais aussi par les bactéries de type de paroi gram négatif et les *Archaea*. Ces protéines sont dotées d'un effet létal (cide, lytique) et/ou statique à spectre relativement large envers les bactéries phylogénétiquement proches ou confinées dans la même niche écologique (beaucoup plus,

de type de paroi gram positif que celles de gram négatif) tout en étant serins pour les bactéries qui les produisent (da Costa *et al.*, 2019 ; Verma *et al.*, 2014 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Guerra & Pastrana, 2002 ; Klaenhammer, 1993 ; Klaenhammer, 1988). La nomination des bactériocines renvoie le non du genre ou l'espèce de la souche où elle dérive pour la première fois avec le suffixe (cine) généralement pour indiquer le pouvoir létal (Karthikeyan & Santhosh, 2009). Le mécanisme d'action moléculaire de ces protéines biologiquement actives, est encore non claire, mais il requiert l'adsorption et la fixation de la bactériocine aux récepteurs spécifiques de la surface membranaire de la cellule cible, l'interaction électrostatique avec la membrane plasmique et la formation des pores occasionnant une dissipation de la force proton-motrice, la dégradation de la ADN, le clivage de ARNr16s et l'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes, entraînant, de ce fait, la mort cellulaire (Tenea & Yépez, 2016 ; Todorov, 2009 ; Deegan *et al.*, 2006 ; Bauer *et al.*, 2005 ; Corsetti *et al.*, 2004 ; Nes & Johnsborg, 2004 ; Atrih *et al.*, 2001). Le mécanisme de biosynthèse des bactériocines est régulé par un système QS pour contrôler l'expression de gènes localisés sur le chromosome (mersacidine), ou bien sur un plasmide (sakacine A), ou encore sur un transposon (la nisine et de la lacticine 481) (Dufour *et al.*, 2000 ; Altena *et al.*, 2000 ; Axelsson *et al.*, 1995 ; Rauch *et al.*, 1992). Comme le sont, les bactéries lactiques, les bactériocines sont largement reconnues de posséder le statut GRAS, et sont dès lors inactives et non toxiques aux cellules eucaryotes, dégradables par les protéases digestives dans le tractus gastro-intestinal, généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH, non antibio résistantes et non dysbiotiques vis-à-vis du microbiote intestinal, à déterminants génétiques codés par les plasmides. Elles ont attiré, par leur innocuité, une attention particulière de la biotechnologie alimentaire comme des agents sûrs, à potentiel biopréservateur, en permettant la réduction de l'utilisation des conservateurs chimiques et limitant l'effet négatif sur la santé du consommateur, aussi sont utilisées pour étendre la durée de vie des aliments (da Costa *et al.*, 2019 ; Martinez *et al.*, 2013 ; Reis *et al.*, 2012 ; Castellano *et al.*, 2008). De même, les bactériocines sont employées comme des agents antiviraux, compléments adjuvants des antibiotiques, régulateurs du microbiote intestinal, promoteurs de croissance des plantes (PGPR), agents anticancéreux, et bien d'autres fonctions émergentes (Dridier *et al.*, 2016). La nisine, produite par *Lc. lactis*, demeure la seule bactériocine commercialisée et utilisée comme additif alimentaire (réglementée E234), alors que d'autres bactériocines sont en cours d'être

autorisées pour différents usages (Biscola *et al.*, 2013 ; Taheri *et al.*, 2012; Delves- Broughton, 2005) tel le cas de la pédiocine récemment approuvée par la FDA (Mokoena, 2017 ; EFSA, 2006).

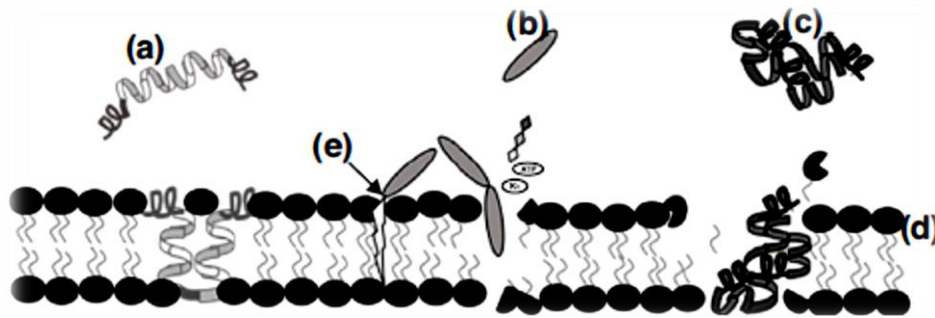


Figure 3.3 : Mécanisme d'action des bactériocines selon les classes. (a) classe II. (b) classe I, effet de la nisine. (c) classe III. (d) membrane cytoplasmique. (e) lipide II (de Souza *et al.*, 2017)

Les bactériocines des bactéries lactiques représentent une large gamme hétérogène de peptides qui se diffèrent considérablement sur le plan biochimique et structural (poids moléculaire, charge électrique, présence des régions hydrophobes et/ou hydrophiles), l'origine génétique, et dans leur activité métabolique (spectre et mode d'action) (da Costa *et al.*, 2019 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Klaenhammer, 1988). Actuellement, les bactériocines peuvent être classées simplement selon le type de gram de la souche productrice en deux catégories, dont celles des bactéries à gram positif est la plus diversifiée et la plus étudiée puisqu'elles incluent les bactériocines issues des bactéries lactiques : (1) classe I (bactériocines subissant des modifications post-traductionnelles et subdivisées en trois sous-classes : lantibiotiques, labyrinthopeptides et sactibiotiques) ; classe II (bactériocines ne subissant aucune modification post-traductionnelle, subdivisées en quatre sous-classes : II a, II b, II c et II d) et la classe III (bactériolysines) ; (2) classes I (colicines de poids moléculaire 30 et 80 kDa agencées en groupe A et B) et classe II (microcines de faible poids moléculaire compris entre 1 et 10 kDa agencées en sous classe i et ii) (Tableau 3.3) (da Costa *et*

al., 2019, Naimi, 2018 ; Reinberg, 2015 ; Rebuffat, 2011 ; Cotter *et al.*, 2005). Elles peuvent aussi être classées en deux principales classes : (1) les lantibiotiques ; bactériocines renfermant des acides aminés soufrés inhabituels (lanthionine, β -méthyllanthionine, déhydroalanine et déhydrobutyrine) formées par modifications post-traductionnelles, thermostables, de taille inférieure à 5 kDa, contenant un peptide (nisine) ou deux peptides (lacticine 3147) ; (2) les bactériocines non modifiées contenant les résidus d'acides aminés standards, thermostables de taille inférieure à 10 kDa contenant un peptide (pédiocine PA1), deux peptides (lactacine F), ou de structure cyclique (entérocline AS 48), et pouvant être sous-classés en : IIa (*pediocin-like*), IIb des (*two-peptides*), IIc (bactériocines circulaires) et IId (bactériocines non modifiées et non *pediocin-like*) (Cotter *et al.*, 2013 ; Drider *et al.*, 2011 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Diep & Nes, 2002).

Les bactériocines sont encore groupées en trois classes : (1) les lantibiotiques de taille inférieure à 5 KDa, renfermant des acides aminés inhabituels tels que la lanthionine et la β -méthyllanthionine ; (2) les petits peptides non lantibiotiques de taille inférieure à 10 KDa, thermorésistants ; (3) les protéines thermolabiles de poids moléculaire supérieur à 30 KDa (Diep *et al.*, 2002). Cependant une quatrième classe, renfermant des petits peptides cationiques de structure cyclique, a pu être ajoutée (Maqueda *et al.*, 2004).

Tableau 3.3 : Classification et caractéristiques des bactériocines des bactéries lactiques en deux types selon le type de gram du producteur (**Rebuffat, 2011 ; Cotter et al., 2005**)

Groupes	Classes	Sous-classes	Caractéristiques	Exemples
Gram positif	Classe I (modifiées)	Lantibiotiques	Acide aminé lanthionine	Nisine ; Epidermine, lacticine 3147
		Labyrinthopeptines	Acide aminé labionine	Peptide A1 et A2
		Sactibiotiques	Liens soufre- α -carbone	Thuricine CD, Subtilolisine A
	Classe II (non modifiées)	a) « pediocin-like »	Motif YGNGV conservé, actifs contre <i>Listeria</i>	Pédiocine PA-1
		b) à 2 composantes non-modifiées	2 peptides	Lactococcine G, Abp118
		c) circulaires	Cycliques	Entéroccine AS-48
		d) linéaires « non pediocin-like » à une composante	Linéaires non-pediocin-like à 1 peptide	Lactococcine A, lacticine Q
Bactériolysines	-	Larges, thermolabiles, lytiques	Lysostaphine, entérolyisine A	
Gram négatif	Colicines	A	30-80 kDa, protéine de lyse co-exprimée	Colicine E1, colicine A
		B		Colicine B, colicine M
	Microcines	I	1-10 kDa, résistantes aux protéases, T° et pH extrêmes	Microcines J25, Microcines B17
		II		Microcines 492, Microcines M

Néanmoins, la classification de base, reste celle de **Klaenhammer, (1993)**, divisant les bactériocines en quatre classes principales : (1) les lantibiotiques (présence du résidu lanthionine et 3'-méthyllanthionine), regroupant les bactériocines modifiées, subdivisées en plusieurs sous-classes en fonction de leur structure (type A I et/ou A II, type B) ; (2) les bactériocines thermostables non modifiées, subdivisées en trois sous-classes (II a, II b et II c) ; (3) les bactériocines thermolabiles de grande taille et (4) les bactériocines les plus complexes composées de protéines et portant une (ou plusieurs) composants non-protéiques, lipidiques et/ou oligo-saccharidiques (**Tableau 3.4**).

Tableau 3.4 : Classification et caractéristiques des bactériocines des bactéries lactiques
(Klaenhammer, 1993)

Classes	Sous classes	Caractéristiques	Exemples
I	Type A I/ A II	Les lantibiotiques : petites peptides de PM <5 kDa, contiennent des acides aminés inhabituels soufrés, la lanthionine, β -méthyl lanthionine et d'autres déshydratés (déhydrobutyrine, et déhydroalanine). Allongés / contiennent des régions en anneaux.	Nisine
	Type B	Globulaires chargés négativement ou sans charge nette.	Mersacidin
II	IIa	Peptides, hydrophobiques, thermostables de PM<10 kDa. Pediocin-like à activité anti-listeria.	Pediocin PA-1 Lactococcin G Lactococcin B
	IIb	Deux oligomère différents aboutis un ensemble biologiquement actif.	
	IIc	non-pediocin-Like composé de bactériocines activées par la présence des thiols.	
III		Peptides thermolabile.	Helveticin J
IV		Protéines complexes.	Plantaricin S

Afin de détecter l'effet antimicrobien des métabolites produits par les bactéries lactiques, il existe de nombreuses techniques de screening donnant des estimations de l'activité inhibitrice de la croissance d'un microorganisme cible qui dépend fortement de la diffusion de ces métabolites à travers différentes géloses solides et/ou semi solides en une seule ou en double couches (MRS, M17, PCA, TGEA, TSA, MH, etc.) (Azevedo *et al.*, 2018 ; Moraes *et al.*, 2010 ; López-Malo *et al.*, 2005). Ces techniques sont des variantes de deux protocoles (direct et indirect) initialement décrits par Fleming *et al.*, (1975) : *spot on the lawn*, qui consiste à cultiver les deux souches dans le même milieu et Tagg & McGiven, (1971) : *well diffusion assay* qui permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec la souche indicatrice pour confirmer l'activité antimicrobienne (Moraes *et al.*, 2010). Cependant il est souligné important de tester l'activité inhibitrice, à la fois par les deux techniques (Tagg *et al.*, 1976) puisque généralement, la technique *spot on the lawn* révèle toujours une activité antagoniste dans une proportion plus élevée par rapport à celle observée par *well diffusion assay* (Moraes *et al.*,

2010). Néanmoins, la fiabilité n'est atteinte que lorsque les techniques prennent en considération au moins six (6) facteurs quantitatifs, à savoir ; (i) la nature de la souche cible, (ii) sa charge et son état physiologique, (iii) la concentration de la souche test et/ou ses métabolites, (iv) le temps d'exposition, (v) le taux de croissance optimale des cibles et test et (vi) le choix de la gélose utilisée pour l'investigation de l'activité antimicrobienne. La puissance inconnue de l'agent antimicrobien est la résultante de la charge de la souche test (cible), la concentration de l'agent antimicrobien ainsi que la taille de la zone d'inhibition (López-Malo *et al.*, 2005). Récemment, le NCCLS (*National Center for Clinical Laboratory Standards*) a publié des techniques standardisées comprenant : (1) techniques de screening *in vitro* (*agar diffusion, agar and broth dilution, gradient plates, spiral plating, sanitizer and disinfectant tests, turbidimetric assays, inhibition curves*), (2) techniques de tests appliqués (*endpoint methods, inhibition curves*) et (3) techniques de tests combinés (*agar diffusion, dilution assays, inhibition curves*), utilisées afin de dévoiler l'activité inhibitrice des substances antibiotiques et aussi des agents antimicrobiens (Schwalbe *et al.*, 2007 ; López-Malo *et al.*, 2005).

L'objectif de cette partie était d'isoler et de caractériser phénotypiquement, des souches lactiques autochtones de viande algérienne douée d'activité antimicrobienne, afin d'initier un souche ainsi qu'une utilisation probable comme agents bio compléments alimentaires ou médicaux.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Matériel de paillasse et produits de laboratoire

a. Matériel de paillasse

- Agitateur à plaque chauffante *Ikamag*[®] ; *Labtech*[®] *LMS1003* ;
- Agitateur Vortex *Labox Vorx*[®] *005-001* ;
- Autoclave *Wiseclave Wac*[®] ;
- Bain-marie *Memmert*[®] ;
- Balance : analytique *Radwag*, de précision *Ohaus*[®] *SE402F* ;
- Bec Bunsen[®] ;
- Centrifugeuse de paillasse *Ez Swing*[®] *3K* + tubes de centrifugation ;
- Spectrophotomètre *Optizen*[®] *1412V* + cuvettes en quartz ;
- Compteur de colonies *Fischer Scientifique*[®] ;

- Dessiccateur transparent en polycarbonate ;
- Distillateur *Labtech*® *WD-2004F* ;
- Étuve *Memert*® *UN30* ;
- Incubateur bactériologique *Binder*® *BD53*, *Ecocell*® ;
- Loupe binoculaire *Motic*® *ST30-C-2L00* ;
- Microscope optique *Motic*® série *B* ;
- Minuterie avec affichage de température ;
- pH-mètre *Ohaus*® ;
- Congélateur *Liebherr*® ; réfrigérateur *Eniem*® ; glacière et accumulateurs de froid ;
- Software pour l'exploitation des résultats (Microsoft 2016 (Office, Excel), feuilles Excel API50, *OriginLab*® pro v9.5).

b. Produits de laboratoire

- Anse de platine ; ciseaux ; pince stérile ; spatule ;
- Bac de coloration ;
- Boîtes de Pétri stériles à usage unique ;
- Cloches de Durham stériles ; pipettes Pasteur ; tubes à essai ;
- Coton cardé ; gants en latex ;
- Micropipettes réglables : 10-100 µL ; 100-1000 µL ;
- Embouts bleus 1000 µL et embouts jaunes 200 µL ;
- Papiers : parafilm ; collant ; filtre et hygiénique ;
- Portoirs métalliques ; statifs en bois ; verrerie sèche et propre ;
- Règle millimétrique ; appareil photo numérique ; marqueur noir ;
- Huile minérale : à immersion ; de vaseline et de paraffine ;
- Eau oxygénée à 10 % (10 V) ; éthanol à 95° ;
- Violet de gentiane ; fuschine de Ziehl (basique) ; lugol ;
- Peptones : peptone de caséine ; peptone de viande ;
- Extrait de levure ; extrait de viande ;
- Phosphate di-potassique (K_2HPO_4) ; Phosphate mono-potassique (KH_2PO_4) ; Nitrate de potassium (KNO_3), Thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$), Fer III ammonium sulfate ($NH_4Fe(SO_4)_2$), Chlorure de sodium (NaCl), Hydroxyde de sodium (NaOH), Acide chlorhydrique (HCl) ;
- Glycérol ; agar bactériologique ;
- Solution tampon phosphate : pH 4, pH 7.01, pH 7.02 et pH 7.4 (0.1M) ;
- Solution étalon de sulfate de Barium $BaSO_4$ (0.5 McFarland) ;
- Sucres : glycérol, D (+) glucose, D (+) maltose, D (+) galactose, saccharose, D mannitol, L rhamnose, D (+) lactose, arabinose, D fructose, raffinose, D xylose, sorbitol ;
- Réactifs de révélation : Nit1, Nit2 ;

- MRS (*De Man., Rogosa & Sharpe, Pronadisa™*) ;
- TSB (*Trypticase Soy Broth, Pronadisa™*);
- TSE (*Tryptone Sel Eau*) ;
- Urée ; arginine ; vancomycine ;
- Vert de bromocrésol (VBC).

3.3.2 Isolement et tests d'orientation

L'isolement des bactéries lactiques a été réalisé sur deux géloses MRS : (1) MRS supplémentée avec le vert de bromocrésol et la vancomycine (25 mg/L) (MRS-V-VBC) (*MRS, Pronadisa™* ; vert de bromocrésol, *Sigma* ; vancomycine, *Mylan*) et (2) MRS acidifiée au pH 5.2 ± 0.2 (MRS-Ac). Ensuite, les isolats ont été recueillis à partir des colonies de différentes morphologies par repiquage sur gélose MRS à 30 °C pendant 48 h en anaérobiose (*Najjari et al., 2008 ; Dal Bello, 2005 ; Guiraud, 1980*). Afin de s'assurer de la pureté des clones, la purification des isolats a été réalisée par des transferts successifs d'une manière différentielle (stries d'épuisement) dans les mêmes conditions d'incubation (*Guiraud, 1980*). Les isolats purs ont été soumis à des tests d'orientation, à savoir : la coloration de gram, le test de catalase et celui de sporulation, puis, ceux présumés appartenir au groupe lactique ont été conservés à court terme.

a. Coloration de gram

La coloration de gram a été réalisée suivant le protocole conventionnel cité par *Chaskes, (2009)* : des lames ont été préparées, d'abord par étalement de la suspension bactérienne sur une surface de 2 cm² environ, et fixées par passage au-dessus de la flamme du bec pendant quelques minutes. Puis, les préparations ont été inondées en série par les solutions de gram séparées les unes des autres par un lavage à l'eau distillée, dans cet ordre : coloration par le violet de gentiane (1 min), fixation par le lugol (1 min), décoloration par l'éthanol (15 sec), contre coloration par la fuschine diluée au 15^{ième} (1 min) pour être, enfin, asséchées et examinées par observation microscopique au grandissement x100 (en immersion).

b. Test de catalase

L'activité catalasique des isolats lactiques a été recherchée en introduisant directement dans un tube contenant l'inoculum bactérien (culture jeune de 18 h) une petite quantité du H₂O₂ à 10 V. L'activité de cette enzyme due à la dégradation du H₂O₂ et le dégagement de bulles de dioxygène (O₂) est repérée par une effervescence (Larpen-Gourgaud *et al.*, 1997 ; Hart, 1997).

c. Test de sporulation

Ce test a été réalisé par essai de culture après pasteurisation. La survie des cultures jeunes de 18 h des isolats lactiques traités à 80 °C pendant 10 min dans un bain-marie a été vérifiée sur gélose MRS à 30 °C pendant 48 h en anaérobiose (Guiraud, 1980).

d. Maintien à court terme

Une première conservation à court terme des isolats lactiques à l'état pur, a été réalisée sur gélose MRS inclinée à + 4 °C, ceci pour un usage journalier et/ou hebdomadaire. Ces cultures sont à renouveler toutes les quatre semaines (Brenner *et al.*, 2005 ; De valdez, 2001).

3.3.3 Test de screening

a. Matériel bactérien

Sept (7) souches pathogènes, essentiellement à gram positif, codifiées de C1 à C7 ont été utilisées comme souches indicatrices pour le screening de l'activité antibactérienne des candidats lactiques. Il s'agit de cinq (5) souches référenciées *American Type Culture Collection* (ATCC), une (1) référenciée *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT) et une (1) autochtone isolée à partir de *Guedid* (Tableau 3.4). Ces souches, à l'origine conservées à + 4 °C sur gélose inclinée pour un usage à court terme, ont été régénérées dans le bouillon trypticase de soja (*TSB, Pronadisa*[™]) à 37 °C pendant 24 h, puis ensemencées sur gélose trypticase de soja (*TSA, Pronadisa*[™]) à 37 °C pendant 24 h afin d'obtenir des colonies isolées et préparer des suspensions bactériennes, qui vont être utilisées pour tous les inocula de la présente étude. Un contrôle de la qualité de ces souches a été établi en réalisant les deux tests d'orientation : la coloration de gram et la catalase.

Tableau 3.5 : Souches indicatrices

Microorganisme pathogène	Référence		Codification
	CECT	ATCC	
<i>B. cereus</i>	-	ATCC 11778	C1
<i>En. Faecalis</i>	-	ATCC 29212	C2
<i>L. ivanovii</i>	-	ATCC 19119	C3
<i>St. aureus</i>	-	ATCC 25923	C4
<i>St. aureus</i>	-	ATCC 43300	C5
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	C6
<i>Cl. perfringens</i>	CECT 486	-	C7

b. Test de spots sur gélose

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été entamée en utilisant les pathogènes cibles, afin de chercher un ou plusieurs isolats lactiques capables d'inhiber leur croissance selon la technique directe en culture duel (*agar spot test in dual culture*) (Morales *et al.*, 2010 ; Schillinger, 1989 ; Fleming, 1975). Pour se faire, sept (7) isolats lactiques test obtenus à partir des colonies jeunes (24 h à 30 °C) ont été ensemencés par touches (spots) sur la surface de 12 mL de gélose MRS base agar (1.5 % agar) préinoculée avec 100 µL de la suspension bactérienne de souche cible standardisée, en utilisant le TSE stérile comme diluant, à une charge équivalente de 0.5 McFarland (DO compris dans 0.08 - 0.1 ; concentration cellulaire 10⁸ UFC) (Domínguez, 2001). L'incubation a été entreprise à 30 °C pendant 24 h en anaérobiose et la lecture des résultats a été réalisée en plaçant les boîtes couvercle en bas sur le compteur de colonies muni d'un système d'éclairage. L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant par une règle millimétrique le diamètre de la zone d'inhibition, considéré comme positif à partir de 0.5 mm. L'expérience a été répétée deux fois.

c. Test de diffusion en puits sur gélose

Les isolats lactiques jugés être les plus performants dans le test précédant ont été retenus pour la détection de leur activité contre les cibles les plus sensibles selon la technique indirecte de diffusion en puits sur gélose (*well diffusion assay*) (Schillinger, 1989) légèrement modifiée. Leurs cultures jeunes en suspension centrifugées à 6000 rpm pendant 20 min (Jones, 2008) ont été réchauffées à 80 °C pendant 10 min dans un bain-marie pour exclure toute formes de vie végétative, puis refroidies à + 4 °C (Harris, 1989). Une couche de 10 mL de gélose TSA base agar (1.5 % agar) a été recouverte par une deuxième couche de gélose TSA top agar (0.75 % agar)ensemencée avec 200 µL de la culture cible standardisée à 0.5 McFarland (Domínguez, 2001). Après un court entreposage à 20 °C (Ayr-Hartinag, 1972), sept (7) puits de 7 mm de diamètre par boîte ont été creusés à l'aide de l'extrémité ouverte de la pipette Pasteur stérile, dans une distanciation équilibrée de 3 cm, pour recevoir chacun un volume de 50 µL de surnageant d'une culture lactique différente mis à part le septième puits témoin au centre qui recevait un bouillon MRS stérile. L'incubation à 30 °C pendant 24 h, a été précédée par une préincubation à 20 °C pendant 2 h pour que le surnageant puisse se prédiffuser. L'activité antibactérienne a été évaluée de la même manière que dans le test précédant. L'expérience a été répétée plusieurs fois.

d. Exclusion de l'inhibition par l'acidité

Une gélose TSA tamponnée pH 7.4 (0.1 M) préparée dans un rapport de 19.5 parts de K_2HPO_4 (0.2 M) et 30.5 parts de KH_2PO_4 à (0.2 M) complétés à un total de 100 parts de l'eau distillée (Kuhlmann, 2006) a été utilisée pour la détection de l'activité antibactérienne hors acide, essentiellement, lactique en appliquant les deux techniques précédentes (test de spots et celui de diffusion en puits sur gélose). L'inhibition par le H_2O_2 a été éliminée par incubation dans les conditions d'anaérobiose (Vermeiren *et al.*, 2004). Sept (7) isolats de bactéries lactiques ont été testés par souche cible par boîte. L'incubation et la lecture des résultats ont été faites comme précédemment cité.

e. Analyse des résultats

Au bout de ce screening, les isolats lactiques démontrant une activité inhibitrice importante ont été retenus à l'issue d'une comparaison des diamètres d'inhibition au moyen de calcul sur feuille Excel, mais aussi par classement selon leurs diamètres et leurs scores d'inhibition contre les sept (7) souches cibles (Johnson, 2014).

3.3.4 Identification phénétique

La coloration de gram, la catalase, la sporulation, le type fermentaire (CO₂ à partir du glucose), ainsi que la croissance à différentes températures, à différentes concentrations en NaCl et à différentes valeurs de pH, en plus de l'hydrolyse de l'arginine et de l'urée, et par l'occasion la mobilité, l'utilisation des sulfites et des nitrates comme accepteurs d'hydrogène, et la fermentation des sucres, étaient les tests réalisés lors de l'identification phénotypique.

a. Croissance à différentes températures

La croissance à trois températures ; 10, 15 et 45 °C a été testée sur gélose MRS selon la technique de gouttes (Naghili *et al.*, 2013). La gélose MRS a été divisée en six (6) sections, dont chacune recevait une goutte de 10 µL de culture jeune d'isolat lactique. L'incubation a été faite à 10 °C pendant 7 à 10 jours et à 15 °C et à 45 °C pendant 3 à 5 jours (Schillinger, 1987).

b. Croissance à différentes concentrations en NaCl

La faculté de pousser à différentes concentrations de sel a été étudiée sur gélose MRS à 6.5 et 10 % de NaCl par ensemencement selon la technique de gouttes à partir d'une culture jeune de 18 h. L'incubation a été faite à 30 °C pendant 2 à 3 jours (Naghili *et al.*, 2013 ; Schillinger, 1987).

c. Croissance à différentes valeurs de pH

L'habilité de croissance aux pH 3.9, 4.4 et 9.6 a été réalisé sur MRS selon la technique de gouttes à partir d'une culture jeune et jugée après de 2 à 3 jours d'incubation à 30 °C (Naghili *et al.*, 2013 ; Schillinger, 1987).

d. Production de CO₂ à partir du glucose

La détermination du type fermentaire a été réalisée sur gélose MRS molle (semi-solide). L'ensemencement par piqûre centrale a été effectué à partir des cultures jeunes de 18 h, un volume d'environ 100 µL de gélose blanche stérile a été coulé en surface pour construire un bouchon séparant la surface du milieu de l'air. La préparation a été incubée à 30 °C pendant 7 jours. Le CO₂, si libéré au fond du tube, est révélé par l'élévation de la gélose MRS et/ou le bouchon de gélose blanche (Larpent, 1997).

e. Arginine Di-Hydrolase (ADH)

L'hydrolyse de l'arginine de six (6) isolats lactiques par boîte a été vérifiée en micro test sur gélose MRS-BCP-A supplémentée avec le pourpre de bromocrésol et de l'arginine, en ensemençant par spots en surface à partir d'une culture jeune de 18 h. Au terme de 18 h d'incubation à 30 °C, un virage de coloration au jaune autour des spots indique un test négatif. Tandis que, la persistance de la coloration violette implique une activité ADH positive.

f. Uréase

La mise en évidence de l'enzyme hydrolysant l'urée en ammoniac et carbonates d'ammonium a été réalisée en micro test sur gélose uréase ensemencée par spots à partir des cultures jeunes. Six (6) spots de six (6) isolats lactiques ont été ensemençés par boîte. Après incubation à 30 °C pendant 18 h, un virage de coloration au jaune autour des spots indique la dégradation de l'urée (Forouhandeh, 2010 ; Guiraud, 1980).

g. Hydrogène sulfuré (H₂S) et mobilité

La gélose H₂S semi-solide a été ensemencée par piqûre centrale à partir d'une culture de 24 h pour vérifier l'utilisation des sulfites comme accepteur de l'hydrogène en les réduisant en sulfures d'hydrogène. L'incubation a été faite à 30 °C pendant 2 semaines. Un noircissement au niveau de la ligne d'inoculation et/ou, par la même occasion, la mobilité décelée par l'envahissement du milieu indiquent un résultat positif pour les deux tests (Forouhandeh, 2010 ; Larpent & Larpent-Gourgaud, 1990 ; Guiraud, 1980).

h. Nitrate réductase

La gélose à 1 ‰ de nitrate de potassium (KNO_3) ensemencée en spots des cultures jeunes lactiques a été utilisée pour la détection de l'enzyme catalysant la réaction de l'utilisation des nitrates NO_3 en les réduisant en nitrites NO_2 . Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 48 h et la réduction des nitrates en nitrites est révélée par l'ajout de 0.1 mL des réactifs Nit1 et Nit2. Une coloration instantanée rose rouge indique une réduction positive (Forouhandeh, 2010 ; Larpent & Larpent- Gourgaud, 1990 ; Guiraud, 1980).

i. Assimilation des sucres

L'assimilation des sucres a été investiguée en micro test en spots des cultures jeunes lactiques (12/boîte) sur gélose MRS-BCP additionnée avec une concentration finale de 2 % du sucre à étudier. L'incubation à 30 °C a été abrégée à 18 h au maximum en raison du rapprochement des spots et pour que les résultats soient mieux perceptibles. Un virage de la coloration du milieu au jaune, suite à la fermentation du sucre qui s'accompagne d'une acidification, indiquant son assimilation.

j. Analyse des résultats et regroupement des isolats lactiques

A l'issue de cette batterie de tests d'identification phénétique, une analyse numérique a été effectuée au moyen des feuilles Excel dotées de bases d'identification des principaux genres de bactéries lactiques, ainsi que leurs espèces (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Carr *et al.*, 2002 ; Orla-Jensen, 1919). Le traitement des résultats se fait par calcul de l'indice de ressemblance. En conséquence, les isolats lactiques les plus redoutables ont été regroupés pour les tests de recherche ultérieurs.

k. Maintien à long terme

Une seconde conservation à long terme a été entretenue sur bouillon MRS additionné au glycérol MRS-G à une concentration finale de 20 % dans des cryotubes libellés avec un marqueur et conservés à -20 °C pour plusieurs mois. Rappelant que le glycérol joue le rôle de cryoprotecteur (Brenner *et al.*, 2005 ; De valdez, 2001).

3.4 Résultats

3.4.1 Résultats de l'isolement et tests d'orientation

– **Isolement** : l'isolement des bactéries lactiques, à partir de dix-sept (17) échantillons *Guedid* préparés en portions en formes de dés, a permis d'obtenir deux cents et un (201) isolats, numérotés de LK1 à LK201. Ces derniers ont été repérés d'une manière aléatoire sur la surface des deux géloses (MRS-Ac et MRS-VBC-V). Lors de la purification différentielle par les trois repiquages successifs, l'observation de leurs caractères macroscopiques effectuée à l'œil nu et à l'aide de la loupe binoculaire a donné ; sur gélose MRS-Ac des colonies circulaires, plates et à bords réguliers, de couleur crème, opaques, de petites à moyennes tailles, ayant toutes un aspect lisse (*smooth*) et une consistance crémeuse. Alors que, sur gélose MRS-VBC-V ; des colonies, toujours, affichant les mêmes caractéristiques, mais de couleurs très diverses (verte, verte claire avec centre vert, blanche, blanche avec centre vert, et grise) (**Figure 3.4**).

– **Tests d'orientation** : parmi les isolats, ceux à catalase négative ont été retenus et vingt-huit (28) ont été à catalase positive, donc écartés. En ce qui concerne la coloration de gram, celle-ci a permis de retenir cent-soixante-treize (173) isolats montrant une coloration pourpre signifiant que ce sont à type de paroi gram positif, avec trois formes (bacille, cocci et coccobacille) et présentant divers modes d'association cellulaire (isolées, en paires, tétrades, chainettes, palissades et amas). En raison de leurs nombres, les résultats sont donnés en pourcentage de répartition sur les formes ; 32 % bacilles, 52 % cocci, 16 % coccobacilles. S'agissant du test de sporulation, il a été négatif suite à leur non-croissance sur gélose MRS. Ces isolats sont représentatifs du groupe de genres de bactéries lactiques comme le montre la **Figure 3.5**. Il est à noter que seize (16) isolats ont été perdus au cours des repiquages mensuels.

3.4.2 Résultats des tests de screening

– **Spot agar test** : la mise en évidence et l'évaluation d'une éventuelle activité antimicrobienne des cent cinquante-sept (157) isolats de bactéries lactiques retenus, à l'issue des tests d'orientation, vis-à-vis des sept (7) souches pathogènes et/ou d'altération, a donné des diamètres exprimés en

millimètres allant de 0.5 mm à la valeur la plus haute qui a touché les 30 mm (**Tableau 3.6, Figure 3.6**). Suite à l'analyse de ces résultats au moyen de l'Excel 2016 :

(i) D'un ensemble de 1099 contacts des isolats de bactéries lactiques avec les sept souches cibles, 97 % ont montré un effet inhibiteur positif contre seulement 3 % d'effet inhibiteur négatif;

(ii) Tous les isolats lactiques montrant une activité antibactérienne contre les pathogènes cibles avec des diamètres allant de 10 à 30 mm sont notés par (+++) et marqués en premier degré contre : *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212, *St aureus sp.* et *St. aureus* ATCC 43300 ; en deuxième degré contre *L. ivanovii* ATCC 19119, *Cl. perfringens* CECT 486 ;

(iii) La concentration de l'activité inhibitrice a été constatée chez la totalité des isolats lactiques avec des diamètres de 12 à 19 mm notés par (++) contre la majorité des bactéries cibles ;

(iv) Le classement des isolats de bactéries lactiques selon les diamètres et les scores d'inhibition contre les sept (7) souches pathogènes cibles montre que l'activité inhibitrice de la totalité des isolats a été concentrée dans l'intervalle de 12 à 19 mm. Aussi, il affiche que quarante-neuf isolats (49) les plus redoutables, avaient des scores (nombre des pathogènes inhibés) de 2, 3, 4 et parfois 5, essentiellement contre *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212, *L. ivanovii* ATCC 19119 et *Cl. perfringens* CECT 486 (**Tableau 3.6, Figures 3.6 et 3.7**). Les quarante-neuf (49) isolats lactiques élus et les 5 pathogènes cibles ont été retenus pour faire l'objet du screening secondaire, dont le principe repose sur la diffusion en puits sur gélose.

– **Exclusion de l'inhibition par l'abaissement du pH** : les résultats du test de l'exclusion de l'inhibition par l'abaissement du pH ont exprimé les mêmes intervalles de mesure des zones d'inhibition, traités au moyen de l'Excel 2016 et avaient le même poids que ceux du test précédent sur le plan qualitatif et quantitatif avec des diamètres atteignant les 26 mm essentiellement vis-à-vis *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212 et *L. ivanovii* ATCC 19119.

– **Diffusion en puits sur gélose** : les résultats du test de la diffusion en puits sur gélose n'ont pas laissé entrevoir une action assez claire pour être considérée, ainsi certains isolats ont permis à

peine de percevoir une action inhibitrice positive ne dépassant pas le 1 mm de diamètre, qui a été plus ou moins prononcé sur gélose TSA tamponnée (Tableau 3.6, Figures 3.6 et 3.7). Il est à noter que dix-neuf (19) isolats ont été perdus au cours des repiquages mensuels.

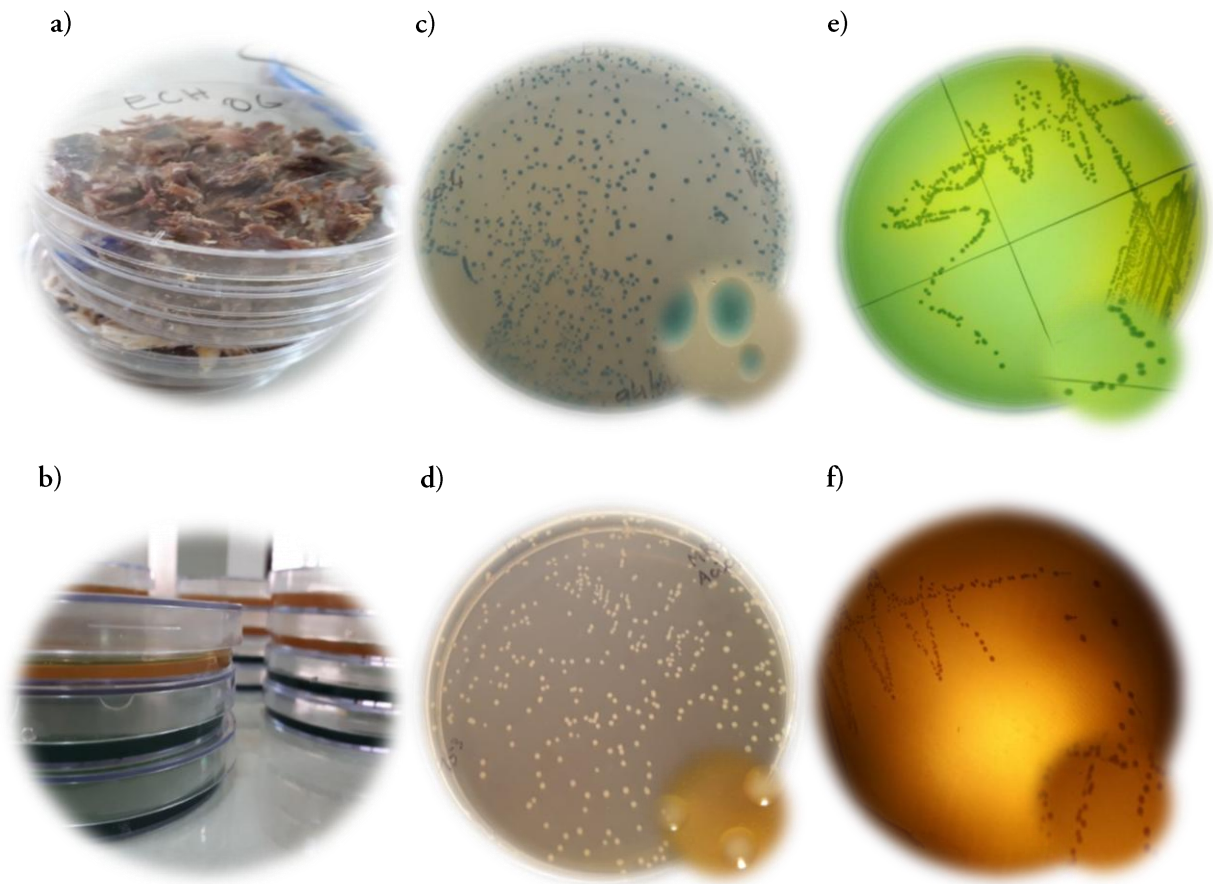


Figure 3.4 : Isolats de groupe de genre de bactéries lactiques. (a) *Guedid* ; (b) gélose (MRS-Ac pH 5.2 et MRS-VBC-V) ; (c, d) aspect de colonies des bactéries lactiques ; (e, f) purification

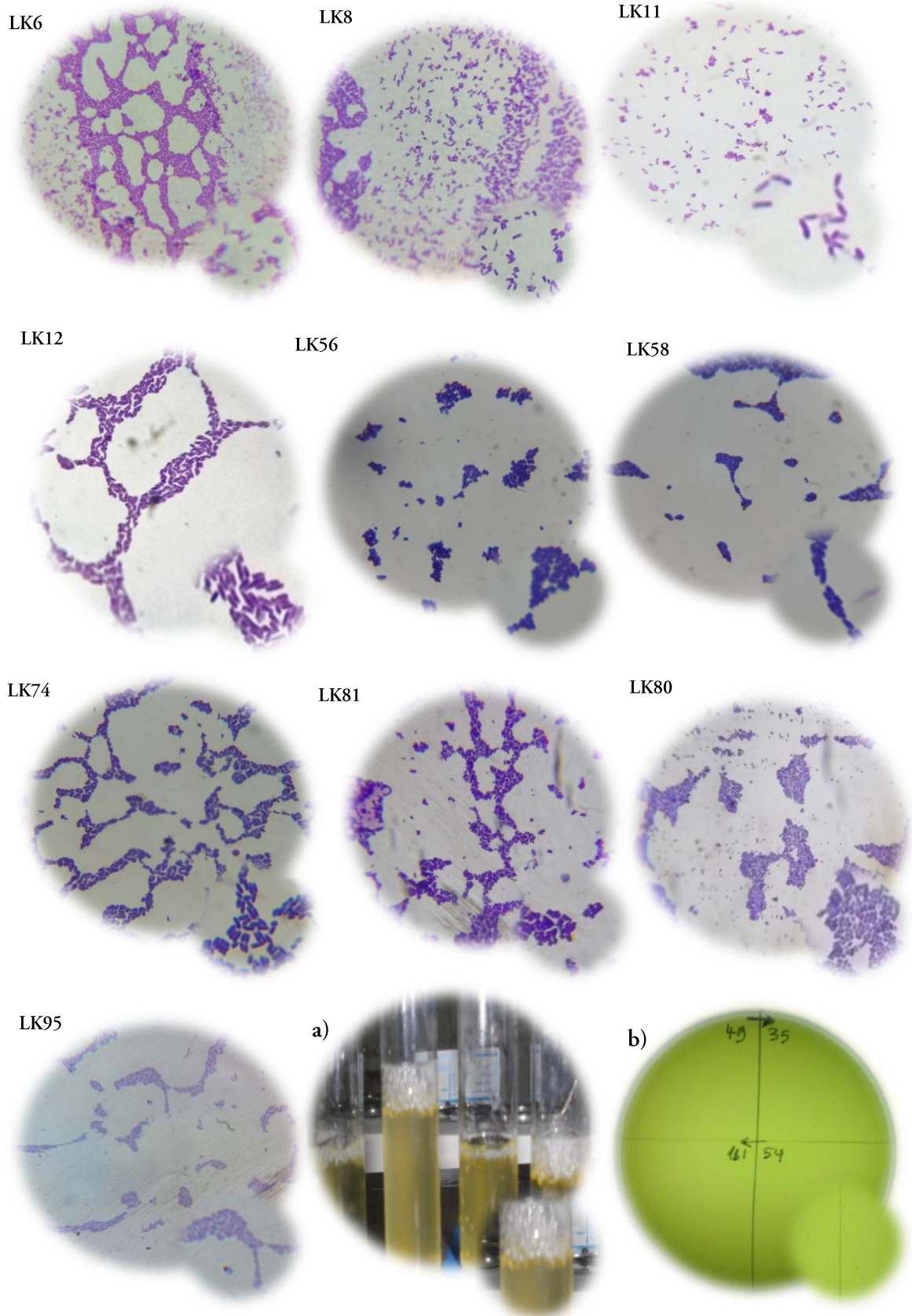


Figure 3.5 : Résultats des tests d'orientation des isolats de bactéries lactiques les plus performants : coloration de gram ; (a) test de catalase ; (b) test de sporulation

Tableau 3.6 : Résultats du screening (*spot agar test*) des isolats de bactéries lactiques sur géloses MRS et TSA-T

LAB	Pathogènes	LAB	Pathogènes	LAB	Pathogènes
LK3	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK6	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>Staphylococcus</i> sp.	LK16	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>Staphylococcus</i> sp.
LK10	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK8	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>Staphylococcus</i> sp.	LK50	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923
LK17	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK11	<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>Staphylococcus</i> sp.	LK56	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 43300
LK18	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK12	<i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>St. aureus</i> ATCC 43300	LK72	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923
LK19	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>Staphylococcus</i> sp.	LK26	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK73	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923
LK46	<i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>St. aureus</i> ATCC 43300	LK42	<i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>St. aureus</i> ATCC 43300	LK80	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>Staphylococcus</i> sp.
LK47	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK58	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK81	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>St. aureus</i> ATCC 43300
LK49	<i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>St. aureus</i> ATCC 43300	LK59	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK84	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 <i>St. aureus</i> ATCC 25923 <i>St. aureus</i> ATCC 43300
LK50	<i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>Staphylococcus</i> sp.	LK74	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 43300 <i>Staphylococcus</i> sp.	LK88	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>En. faecalis</i> ATCC 29212 <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 43300 <i>Staphylococcus</i> sp.
LK22	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK95	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 <i>St. aureus</i> ATCC 25923	LK94	<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 <i>St. aureus</i> ATCC 43300 <i>Staphylococcus</i> sp.

B. cereus ATCC 11778 : 14-19 mm, *En. faecalis* ATCC 29212 : 13-14 mm, *L. ivanovii* ATCC 19119 : 12-14 mm, *St. aureus* ATCC 25923 : 12-16 mm, *St. aureus* ATCC 43300 : 12-14 mm, *Staphylococcus* sp. : 12-13 mm, *Cl. perfringens* CECT 486 ; mm : diamètre en millimètre des zones d'inhibition autour des spots bactériens : (-) : pas d'inhibition, (+) : 0.5-5min, (++) : 5-10mn, (+++) : plus de 10 mm.

3.4.3 Résultats de l'identification phénétique

– **Croissance à différentes températures** : la capacité des trente (30) isolats de pousser à différentes valeurs de température (10, 15 et 45 °C) a montré que tous les isolats ont pu le faire sauf quelques bacilles notamment LK6, 8, 11, 12 et d'autres cocci à l'instar du LK16, 22, 42, 18 qui ont été incapables de pousser à 10 °C. Alors que les LK 8, 12, 42, 18 et les cocci LK94 et LK88 ont été incapables de se développer à la température de 45 °C (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

– **Croissance à différentes concentrations en sel (NaCl)** : tous les isolats de bactéries lactiques ont poussé dans la concentration de 6.5 % sauf les bacilles LK 6, 11, 12 et les cocci LK 3, 17, 22, 46 et LK49. Inversement, la quasi-totalité des isolats n'a pas pu croître à la concentration de 10 % sauf le coccus LK74 (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

– **Croissance à différents potentiels d'hydrogène (pH)** : les trente (30) isolats ont poussé dans des différentes valeurs de pH (3.9, 4.4 et 9.6) à l'exception des cocci LK46 et 49 qui ont montré une incapacité à se développer au pH 3.9 et 4.4. Quant au coccus LK 47, celui-ci s'est montré incapable de se développer seulement au pH 3.9. D'autres isolats ont montré cette incapacité de croissance au pH 9.6, il s'agit de LK 11, 16, 17 et LK18 (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

– **CO₂ à partir du glucose** : pour la production du CO₂, notamment les cocci LK16, 22 et 42 ont été CO₂ positifs ce qui conduit à conclure qu'ils sont de type hétérofermentaire. Le reste a été de type homofermentaire (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

– **Arginine Di-Hydrolase (ADH)** : les trente (30) isolats ont affiché la possession de l'enzyme ADH, suite à la persistance de la coloration violette (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

– **Uréase** : les trente (30) isolats n'ont pas affiché la possession de l'enzyme uréase, suite à la persistance de la coloration bleue (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

– **Hydrogène sulfuré (H₂S) et mobilité** : en ce qui concerne ces deux tests réalisés simultanément, les trente (30) isolats sans exception, ont été H₂S et mobilité négatifs, suite à l'absence de la coloration noire de la ligne d'inoculation et le non envahissement du tube (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

– **Nitrate réductase** : les trente (30) isolats ont été nitrate négatif à l'exception des bacilles LK 11,12 et les cocci LK 18, 46, 73 et LK84 (**Tableau 3.7, Figure 3.8**).

A l'issue de ces résultats, l'identification phénétique numérique des trente (30) isolats lactiques les plus redoutables faisant appel à l'usage des feuilles Excel conçues pour servir de moyen de traitement associé à l'API50 pourrait attribuer : neuf (9) isolats de forme bacillaire au genre *Lactobacillus* avec des tests de probabilités excellents (excellent ID) associés aux probabilités de 0.800, 0.997 et 1.00 (LK6, 8, 11, 12, 26, 58, 59, 74, et LK 95). Sept (7) isolats de forme sphérique ne formant pas de tétrades, au genre *Enterococcus* avec des tests de probabilités excellents associés aux probabilités de 0.800 et 1.00 (LK42, 6, 47, 49, 50, 73, et LK88). Deux (2) isolats de forme sphérique ne formant pas de tétrades, au genre lactique *Weisella* avec des tests de probabilités excellents associés aux probabilités de 0.962 et 1.00 (LK16 et LK22). Onze (11) isolats de forme sphérique formant de tétrades, au genre *Aerococcus* avec un test de probabilité bon (bon ID) associé à la probabilité 0.5 et excellent à la probabilité de 0.990 (LK3, 10, 17, 18, 19, 56, 72, 81, 84 et LK94). Un (1) isolat de forme sphérique formant de tétrades, au genre lactique *Tetragenococcus* avec un test de probabilité excellent associé à la probabilité 0.990 (LK80) (**Tableau 3.7**).

– **Assimilation des sucres sur milieu MRS-BCP en micro test** : l'exploitation du métabolisme des substrats carbonés des isolats lactiques en vue de l'identification au niveau du rang espèce n'a pas été achevée faute des feuilles Excel API50 bien munies pour toucher l'entièreté des espèces remplissant chaque genre au moins les treize (13) principaux du groupe lactique (**Tableau 3.8**, **Figure 3.8**).

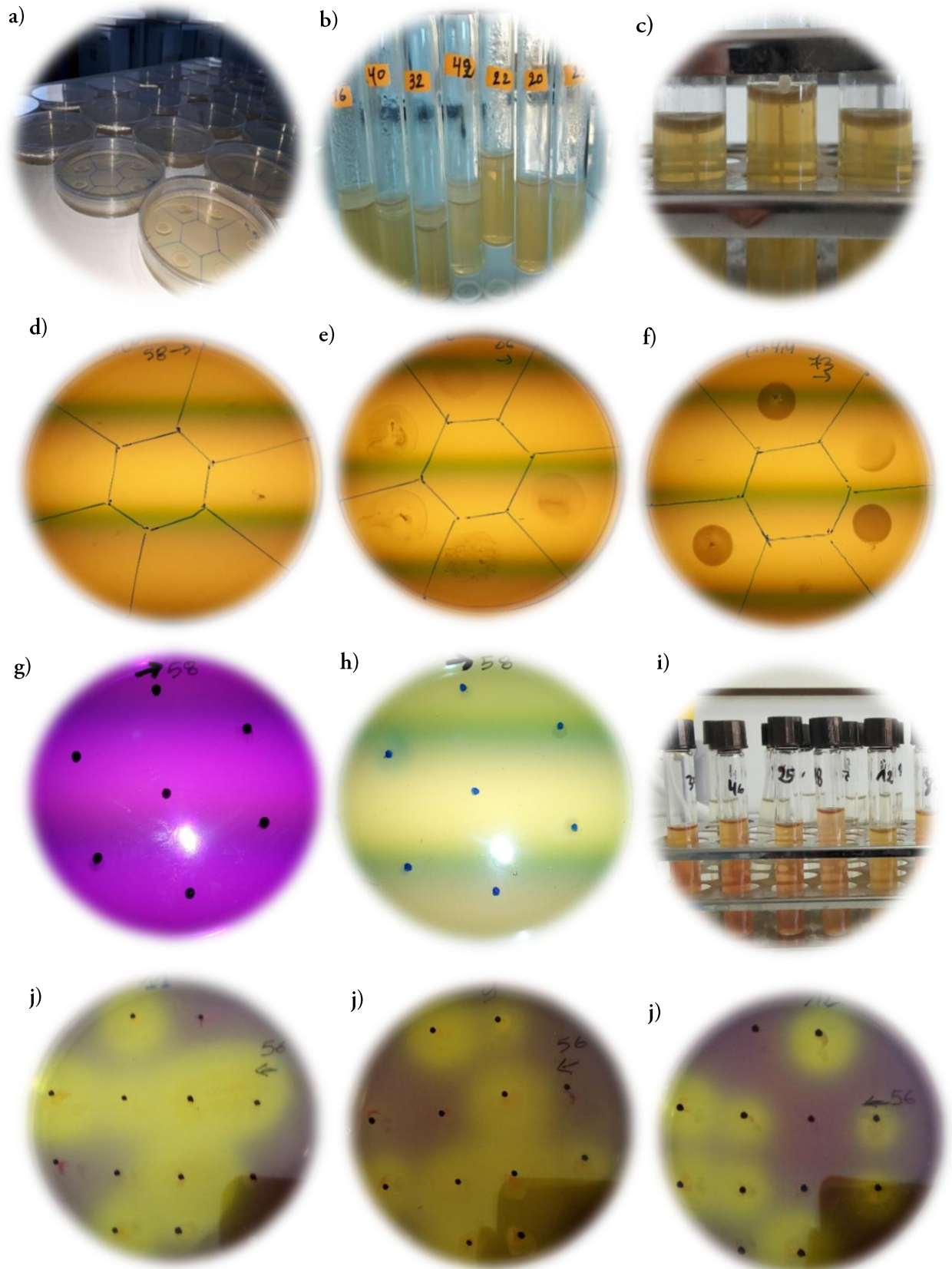


Figure 3.8 : Résultats des tests d'identification des isolats lactiques : (a) ensemencement ; (b) CO₂ ; (c) H₂S et mobilité ; (d, e, f) croissance à différentes (T°, pH, NaCl) ; (g) ADH ; (h) uréase ; (i) nitrates et (j) fermentation des sucres

Tableau 3.7 : Résultats d'analyse numérique d'identification phénétique des isolats lactiques les plus performants

LAB	LK6	LK8	LK11	LK12	LK26	LK42	LK58	LK59	LK74	LK95
Forme	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Tétrade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
6.5 % NaCl	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
10 % NaCl	-	-	-	-	-	±	-	-	±	-
10°C	-	-	±	-	-	+	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+	-	+	±	+	+
30°C	+	+	+	+	+		+	+	+	+
45°C	-	-	±	±	±	-	+	±	+	+
pH 3.9	+	+	+	+	+	±	+	±	+	±
pH 4.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9.6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Résultats	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Prob.	0.997	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000
Typicité	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.33	0.00	0.00	-0.33	0.00
Incompa.	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2
Test sur prob.	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id
Test sur typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité
BUG*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*BUG : probabilité si dans le classement deux valeurs sont égales.

LAB	LK3	LK10	LK17	LK18	LK19	LK46	LK47	LK49	LK50	LK22
Forme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tétrade	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6.5 % NaCl	-	-	-	±	±	-	±	-	±	-
10 % NaCl		-	-	-	-	-	-	-	-	-
10°C	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	±	±	±	+	+	+	+	-
pH 3.9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
pH 4.4	+	+	+	+	+	-	±	-	±	+
pH 9.6	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Résultats	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Weisella</i>
Prob.	0.500	0.990	0.990	0.990	0.990	0.800	1.000	0.800	1.000	0.962
Typicité	-1.00	-1.67	-1.33	-1.00	-1.00	-0.33	-0.33	-0.33	-0.33	-0.67
Incompa.	4	5	6	5	5	3	1	3	1	4
Test sur prob.	Bonne Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id
Test sur typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Bonne typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité
BUG*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*BUG : probabilité si dans le classement deux valeurs sont égales.

LAB	LK16	LK50	LK56	LK72	LK73	LK80	LK81	LK84	LK88	LK94
Forme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tétrade	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
CO ₂	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.5 % NaCl	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 % NaCl	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
10°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
pH 3.9	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9.6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Résultats	<i>Weisella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Aerococcus</i>
Prob.	1.000	0.800	0.990	0.990	1.000	0.990	0.990	0.990	1.000	0.990
Typicité	-0.33	-0.33	-0.33	-0.33	0.33	-0.33	-0.33	-0.33	0.33	0.00
Incompa.	1	3	3	3	1	3	3	3	1	2
Test sur prob.	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id	Excellente Id
Test sur typicité	Bonne typicité	Bonne typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Bonne typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Mauvaise typicité	Bonne typicité	Mauvaise typicité
BUG*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*BUG : pb si dans le classement deux valeurs sont égales.

Tableau 3.8 : Résultats de la fermentation des sucres des isolats lactiques les plus performants

LAB	Glycérol	Amidon	Raffinose	D Lactose	D Fructose	Sorbitol	L Arabinose	D Arabinose	D Xylose	D Mannitol	Saccharose	Galactose	Rhamnose	Maltose	Esculine
LK3	nd	nd	+	-	+	+	±	±	+	-	+	+	-	+	nd
LK10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
LK17	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	nd
LK18	nd	nd	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	nd
LK19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
LK46	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	nd
LK47	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
LK49	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
LK50	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	nd
LK22	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	-	+	nd
LK6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LK8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LK11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LK12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
LK26	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
LK42	nd	nd	+	-	+	+	±	±	+	-	+	+	-	+	nd
LK58	-	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
LK59	+	+	nd	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
LK74	-	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
LK95	+	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
LK16	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	nd
LK50	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	nd
LK56	+	-	nd	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
LK72	-	-	nd	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
LK73	+	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
LK80	+	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
LK81	-	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
LK84	+	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
LK88	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
LK94	+	-	nd	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-

nd : non déterminé.

3.5 Discussion

L'objectif assigné à cette partie étant la caractérisation de l'activité antibactérienne et l'identification phénétique de bactéries lactiques isolées, dans la première étape, à partir du *Guedid* du Sud-ouest algérien (Saïda, Nâama, El-Bayadh, Mascara et Adrar). La vérification de l'activité antibactérienne a été réalisée à l'égard de sept (7) germes pathogènes et/ou d'altération et les isolats lactiques les plus performants en matière de cette activité ont fait l'objet d'une identification phénétique numérique pour les classer dans leur taxin de genre et d'espèce de profils connus au sein du groupe lactique, et ceci après une comparaison des profils existants dans la base de données des feuilles Excel API50, et les noms les plus conséquents ont été attribués.

Les bactéries lactiques font référence à un groupe de genres bactériens dont la mise à jour de la taxinomie systématique de *Bergey's manual of systematic bacteriology* établie par Vos *et al.*, (2011) comprend au minimum les treize (13) genres suivants : *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* et *Carnobacterium*. Ces espèces partagent la caractéristique de produire l'acide lactique comme produit final de la fermentation des glucides et sont à gram positif, à catalase négatif, asporogènes, anaérobies facultatives et/ou micro-aérophiles et de faible pourcentage en G+C (Carr *et al.*, 2002). Celles à effet antimicrobien ont été isolées et caractérisées à partir de divers biotopes à l'instar des produits à base de viandes (Hernández-Aquino *et al.*, 2020 ; Naimi & Khaled 2014 a ; Al-Allaf *et al.*, 2009 ; Najjari *et al.*, 2008 ; Jones *et al.*, 2008 ; Bromberg *et al.*, 2004 ; De Martinis *et al.*, 2001 ;), viandes fraîches et fermentées (Muryany *et al.*, 2017 ; Ghanbari *et al.*, 2013 ; Pringsulaka *et al.*, 2012 ; Todorov *et al.*, 2011 ; Chaiyana *et al.*, 2007 ; Rodriguez *et al.*, 2000), lait et produits à base de lait (Benmechernene *et al.*, 2014 ; Carasi *et al.*, 2014 ; Benreguieg *et al.*, 2013) fruits (Garzon *et al.*, 2017 ; Tenea & Yépez, 2016 ; Gaamouche *et al.*, 2014) ainsi que des produits de la pêche et des fruits de mer (Françoise, 2010 ; Pinto *et al.*, 2009 ; Drider *et al.*, 2006 ; Brillet *et al.*, 2005 ; Leroi *et al.*, 1998).

L'effet antimicrobien est du et à la production de différents produits de fermentation réduisant le pH, essentiellement, l'acide lactique et l'acide acétique, ainsi qu'à d'autres composés de faible poids moléculaire (*LMM : low molecular mass*) comme le H₂O₂, le dioxyde de carbone, le diacetyl (2,3-butanedione), la reutérine, certaines enzymes et molécules de haut poids moléculaire (*HMM : high molecular mass*) dont les bactériocines font la référence (Soumya *et al.*, 2012 ; Polak-Berecka *et al.*, 2009 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Remiger *et al.*, 1999 ; Piard *et al.*, 1992 ; Jay *et al.*, 1983).

La numération des microorganismes, tels que les bactéries lactiques, repose sur certaines techniques de microbiologie classiques et/ou modernes, dont les plus exploitées au niveau des laboratoires sont ; la numération sur lame, la numération sur boîte en surface et en profondeur, le dosage des enzymes, la RT-PCR, en plus de la technique miniaturisée récemment standardisée dite de gouttes (Thomas *et al.*, 2015 ; Naghili *et al.*, 2013).

En l'occurrence des bactéries lactiques, une liste des milieux de culture synthétiques ou complexes (riche répondant aux besoins auxotrophiques) entre bouillon et géloses est utilisée pour l'isolement et l'identification des genres lactiques, parmi eux, certains sont qualifiés électifs comme MRS, LA, M17, APT, etc. et d'autres rendus sélectifs comme AA, MRS, MRSS, MRST, LaS, TA, etc., ceci par l'ajout d'agents inhibiteurs, d'indicateurs de couleur, d'autres ingrédients, ainsi que le remaniement des conditions d'incubation, à savoir le pH du milieu, le temps et la température d'incubation, surtout (Reuter, 1985). Le fait d'opter pour un tel milieu ou un autre, ainsi que les modifications possibles dans sa composition et/ou les conditions d'incubation restent dictées, d'une part, par le biotope étudié, et d'autre part, par les genres et les espèces ciblés par la recherche, à titre d'exemple la préparation MRS est fructueuse pour l'isolement du groupe « LLPW » (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*) à côté d'autres genres secondaires, tels que *Lactococcus* et *Streptococcus* « groupe LS » (Schillinger *et al.*, 2003).

En vue de l'investigation des substances inhibitrices que les bactéries lactiques peuvent produire en addition aux acides organiques, des approches ont été adoptées pour

exclure l'effet acide et dont la plus simple est le recours à la neutralisation des acides par le bais d'utilisation des géloses MRS et/ou TSA tamponnées, préparées en substituant l'eau distillée avec une solution tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4). Cette dernière peut être préparée à base du phosphate monopotassique ou monosodique (KH_2PO_4 ou NaH_2PO_4) à 0.2 M avec le phosphate dipotassique ou disodique (KH_2PO_4 ou NaH_2PO_4) à 0.2 M. Par ailleurs, une solution tampon phosphate saline (PBS) peut être préparée en rajoutant 8.5 g de NaCl (Kuhlmann, 2006).

Les bactériocines, décrites et classées pour la première fois par **Klaenhammer, (1993)**, sont des substances protéiques de synthèse ribosomique produites pendant la phase stationnaire de la croissance, douées d'une activité antimicrobienne dirigée contre un grand nombre de germes pathogènes, particulièrement, ceux phylogénétiquement proches (**Gill & Halley, 2003 ; Cintas et al., 1998 ; Berry et al., 1991 ; Adams & Hall, 1988 ; Andersson, 1986 ; Smith & Palumbo, 1983 ; Hurst, 1981**). Ces bactériocines sont aussi produites par les microorganismes appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Carnobacterium* et sont de prometteurs agents bio-protecteurs assurant une bonne sécurité et stabilité alimentaire, des agents starters assurant la fermentation de nombreux produits alimentaires, mais aussi comme des agents probiotiques voir même à des fins de biothérapie (**Savadogo Aly et al., 2006 ; Leroy & De Vuyst, 2004 ; Atanassova et al., 2001**). Ceci est d'avantage plaidé par le statut *GRAS* pour les cellules et bactériocines attestant une parfaite innocuité (**Anastasiadou et al., 2008 ; Klaenhammer et al., 2005 ; Elegadob et al., 1997**). L'activité antimicrobienne des bactériocines des bactéries lactiques essentiellement dirigée contre les bactéries de type de paroi gram positif que les gram négatif est expliquée par la composition de la paroi des gram négatives contenant une barrière protectrice lipo-polysaccharidique « LPS » (**Dortu & Thonart, 2009 ; Bromberg et al., 2004 ; Boziaris & Adams, 1999 ; Abee et al., 1995**). Les bactériocines se lient aux récepteurs de la cellule cible, elles agissent par formation des pores, la dégradation de l'ADN cellulaire, la perturbation par clivage spécifique de l'ARNr 16S et l'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes (**Murua et al., 2013 ; Deegana et al., 2006**).

L'activité antimicrobienne (antibiose) peut être détectée et évaluée au moyen de plusieurs techniques (Ammor *et al.*, 2006 ; Tagg & McGiven, 1971) qui sont, à la base, issues de deux grandes méthodes : la méthode directe ou simultanée (*spot on the lawn*) et celle indirecte ou différée (*well diffusion assay*) (Fleming *et al.*, 1975 ; Tagg & McGiven, 1971 ; Moraes *et al.*, 2010). L'une ou l'autre méthode est communément utilisée mais il reste important de le faire les deux simultanément (Tagg *et al.*, 1976).

Dix-sept (17) échantillons de *Guedid* préparation maison faisant origine de wilaya différentes comptées pour le Sud-ouest du pays (Saïda, Nâama, El-Bayadh, Mascara et Adrar) ont été acheminés au laboratoire pour faire l'objet d'une préparation des prises d'essai, des dilutions décimales et un encensement sur deux géloses sélectives ; MRS-Ac et MRS-VBC-V. Les deux géloses ont été rendues sélectives afin de bien repérer les bactéries lactiques, particulièrement le groupe « LLPW » (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella*) et le groupe « LS » (*Lactococcus* et *Streptococcus*) (Najjari *et al.*, 2008 ; Schillinger *et al.*, 2003 ; Reuter, 1985). Ces deux conditions d'incubation ont donné occasion au développement des colonies séparées de divers aspects morphologiques (circulaires, crèmes, petites à moyennes, plates et à bords réguliers, opaques, crémeuse et vertes, vertes claires avec centre vert, blanches, blanches avec centre vert, et grises) ainsi qu'à la possibilité de repérer et repiquer puis purifier deux cents et un (201) isolats présumés appartenir au groupe lactique. Ce résultat corrobore avec les caractères typiques cultureux des colonies du groupe lactique sur les géloses utilisées (Carr *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces isolats a été plongé dans une série de tests, dont les trois premiers qualifiés d'orientation : vingt-huit (28) ont été catalase positifs (ayant montré une effervescence prononcée voire faible) et donc écarté par le test catalase ; une enzyme qui joue un rôle important dans la protection des cellules contre les effets toxiques du H₂O₂ (Goyal & Bansak, 2010). Notant que certains lactiques peuvent avoir une pseudo-catalase (catalase hexamérique ou tétramérique) active uniquement en présence de l'hème exogène présent dans le milieu (Tailliez, 2001). Celle-ci contient le manganèse permettant de les protéger contre leur propre H₂O₂ (Strus *et al.*, 2006). La coloration de gram ; un test clé dans la

procédure d'identification systématique des bactéries, permet de distinguer, selon leur aptitude à retenir le violet de gentiane, les bactéries en type de paroi gram positif de celles à paroi négatif après observation au moyen du microscope optique. Les cent soixante-treize (173) isolats lactiques retenus avaient un type de paroi gram positif, dont 32 % bacilles, 52 % cocci et 16 % coccobacilles et une sporulation négative (test pouvant être réalisé par coloration au vert de malachite à 10 %). Le résultat de ce test morphologique est clairement en accord avec les caractéristiques morphologiques du groupe lactique (Doyle *et al.*, 2006 ; Axelsson, 2004 ; Schillinger *et al.*, 2003 ; Carr *et al.*, 2002). Les cent soixante-treize (173) isolats fut ainsi retenus et soumis aux conditions de conservation à court terme afin de les maintenir viables, à l'identique, disponibles et en plein propriétés physiologiques pour les usages ultérieurs. Il est à rappeler qu'un nombre de seize (16) isolats ont été perdus au cours des repiquages mensuels. Une circonstance courante en microbiologie notant que certaines espèces ou souches disparaissent assez rapidement au cours d'une série de transferts (Brenner *et al.*, 2005).

Par la suite, et après avoir satisfait les trois tests d'orientation, les cent cinquante-sept (157) isolats lactiques on fait l'objet de l'épreuve *spot on the lawn* ou *the dual culture overlay assay* (mise en évidence directe de l'activité antimicrobienne), dont le principe est le test de culture en duel (*agar spot test with dual culture*) basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien produit par les bactéries autour du spot d'inoculation pour inhiber ainsi la croissance des sept (7) souches pathogènes cibles (appartenant au même microcosme) pour afficher un pouvoir antibactérien estimé, dans son ensemble, de 97 % et des diamètres de 10 à 30 mm avec un rétrécissement de la limite supérieure à 26 mm sur gélose tamponnée. Cette activité est notée essentiellement à l'encontre de : *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212, *St. aureus sp.* et *St. aureus* ATCC 43300 et en deuxième degré contre : *L. ivanovii* ATCC 19119, *Cl. perfringens* CECT 486 avec une concentration de l'effet inhibiteur pour tous les isolats lactiques dans l'intervalle de 12 à 19 mm. Au terme de ce criblage, ces isolats originaires de *Guedid* ont pu démontrer une activité inhibitrice vis-à-vis des indicateurs gram positifs ; une trouvaille rapportée dans de nombreuses études ultérieures où les bactéries lactiques sont traditionnellement utilisées dans la préservation des aliments

et une variété d'espèces est trouvée antagoniste aux pathogènes associés à ces produits (De Vuyst & Vandamme, 1994). D'ailleurs, les bactéries lactiques sont de loin considérées comme des bio-barrières contre les microorganismes pathogènes, jouant ce rôle par le biais de substances inhibitrices des métabolismes primaires et secondaires (Lee, 2005 ; Reid *et al*, 2003 ; Reid *et al*, 2001). Des études similaires ont dévoilé une bonne activité antimicrobienne à l'encontre de *St. aureus* et *B. cereus* avec des diamètres de l'ordre de 17 et 19 mm respectivement (Shylaja *et al.*, 2010), tandis que d'autres ont rapporté des diamètres de 10 mm signalés par Guessas, (2007), de 9 à 24 mm par Musikasang *et al.*, (2009) et de 12 à 17 mm avec, pour les deux, *St. aureus* comme le pathogène le plus sensible. Pareillement, Mechai *et al.*, (2014), ont noté des diamètres supérieurs à 12 mm et Muryany *et al.*, (2017) ont révélé que seulement le *Lb. plantarum* et le *Lb. pentosus* ont montré un effet antimicrobien envers *St. aureus* avec un diamètre de 14 mm environ. Ces résultats peuvent se comparer avec ceux de l'étude de Naimi & Khaled, (2014 b), qui ont jugé *St. aureus* ATCC 6538 comme le plus sensible suivi de *B. cereus* avec 8.5 à 10.16 mm. La sensibilité de *St. aureus* ATCC 25923 a été aussi remarqué dans l'étude de Abid & Khaled, (2018) suivi, en deuxième degré, par *L. ivanovii* ATCC 19119 et *B. cereus* ATCC 11778 avec des zones d'inhibition allant de 5 à 10 mm. En addition, les bactéries lactiques ont été trouvées particulièrement dotées d'activité anti *L. monocytogenes* (Zacharof & Lovitt, 2012). Des études dans l'optique même, indiquent le rôle important de l'utilisation des bactéries lactiques comme flore de compétition naturelle à l'encontre des microorganismes d'altération et pathogènes *St. aureus* et *L. monocytogenes*, davantage pour la bio-préservation de la composante technologique des viandes et produits de base, tandis que *B. cereus* pour les laits écrémés et les fromages (Rukure & Bester, 2001).

Le classement appuyé sur le diamètre de la zone d'inhibition inhérente à chaque isolat à part, ainsi que le spectre d'inhibition exprimé par un score qui reflète le nombre de pathogènes sensibles a permis de mettre en crête quarante-neuf (49) isolats les plus offensifs envers les cibles les plus vulnérables : *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212 et *L. ivanovii* ATCC 19119, *Cl. perfringens* CECT 486. Le criblage des bactéries lactiques pour l'activité inhibitrice à toujours donné un décroissement en

nombre de candidats, à titre d'exemple, l'étude de **Renata et al., (2004)**, où les auteurs n'ont repéré que cent-vingt-huit (128) isolats à action inhibitrice à partir de (813) isolats candidats testés au départ.

Les quarante-neuf (49) isolats test ont passé l'épreuve du screening secondaire *well diffusion assay* (mise en évidence indirecte de l'activité antimicrobienne) contre les cinq (5) bactéries cibles mais sans avoir démontré une action et spectre d'inhibition décelables. Cela, n'est pas surprenant, à côté des résultats mentionnés dans des travaux antérieurs soulignons, à titre de témoignage, l'étude de **Schillinger & Lücke, (1989)** dont les tests d'activité étaient positifs avec le spot agar test mais négatifs avec la diffusion en puits. Aussi, l'étude de **Lewus et al., (1991)** a montré qu'un petit nombre d'isolats à activité positive testé par la méthode des spots a donné des résultats positifs par la diffusion en puits. Dans l'étude de **Naimi & Khaled, (2014 b)**, des bactéries lactiques isolées des viandes (fraîches et séchées), testées par la même méthode sur gélose TGEA-YE, ont affiché des diamètres restreints par rapport à ceux de screening primaire, et limités à 2 mm contre *St. aureus* suivi de *B. cereus*. Cependant, ces auteurs considèrent que la sensibilité de la technique (*well diffusion assay*) peut être optimisée si on laisse aux bactériocines suffisamment de temps pour diffuser avant l'incubation, ou on élargie le diamètre des puits pour contenir plus de surnageant. Selon ses mêmes auteurs, d'autres facteurs peuvent influencer l'efficacité du surnageants (donnant de faux résultats négatifs) comme l'agrégation, la non diffusion, l'inactivation par des protéases et l'effet de la concentration des bactériocines. Ces résultats négatifs peuvent s'expliquer par le fait que la production des bactériocines n'est pas hautement conservée par quelques souches en raison de leur médiation plasmidique (codées par des plasmides) (**Tagg et al., 1976**), et il peut que les isolats lactiques perdent, probablement, leurs plasmides après des cultures répétitives conséquentes à la purification, les transferts et repiquages de conservation.

A la limite de cette étape de la démarche de l'étude, dix-neuf (19) isolats ont été perdus au cours des repiquages mensuels et des revivifications répétitives imputés à leur disparition (**Brenner et al., 2005**).

Dans la foulée, et dans l'objectif de se prononcer sur leur affiliation genre au moins, les (30) isolats lactiques les plus performants ont subi une série de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques à savoir : leur croissance à différentes températures, concentrations en NaCl et valeurs de pH, leur type fermentaire, l'hydrolyse de l'arginine et de l'urée, leur mobilité, l'utilisation des sulfites et des nitrates comme accepteurs d'hydrogène, et la fermentation de certains sucres ; paramètres qui peuvent fournir des indices utiles pour la caractérisation du genre (Von Wright & Axelsson, 2012 ; Orla-Jensen, 1919). Par conséquent, le traitement des résultats obtenus au moyen des feuilles Excel API50 a permis d'agencer les isolats lactiques à leur identité genre dans la répartition suivante : neuf (9) *Lactobacillus* (LK6, 8, 11, 12, 26, 58, 59, 74, et LK 95), onze (11) *Aerococcus* (LK3, 10, 17, 18, 19, 56, 72, 81, 84 et LK94), sept (7) *Enterococcus* (LK42, 6, 47, 49, 50, 73, et LK88), deux (2) *Weissella* (LK16 et LK22), et un (1) *Tetragenococcus* (LK80) avec des tests de probabilité quasiment excellents alors que l'identification au niveau du taxin espèce a été limitée. Parmi les genres lactiques, *Lactobacillus* appartenant à la même famille *Lactobacillaceae* que *Pediococcus*, et dont plusieurs espèces hétérofermentaires peuvent démontrer la forme sphérique (Pot & Tsakalidou, 2009). Pour ce genre, l'espèce *Lb. rhamnosus*, notamment, a exhibé une activité inhibitrice assez importante (28.5 mm), lors du test impliquant les cellules lactiques viables, et cela vis-à-vis *St. aureus*, parmi un nombre d'indicateurs ciblés (Polak-Berecka, 2009). Ce genre, parmi les genres hétérogènes lactiques, possède un grand potentiel d'application, notamment dans l'agroalimentaire comme cultures starters et bio protectrices, dans la santé et la nutrition humaine comme cultures probiotiques, et dans l'alimentation animale comme agents de fermentation d'ensilage et même comme probiotiques (Giraffa *et al.*, 2010). Parmi les lactique isolés des produits carnés, *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* ont été décrits comme les principaux producteurs des métabolites antimicrobiens et d'être responsables de la production des sakacines et des curvacines, respectivement (da Costa *et al.*, 2019). Quant au genre *Weissella*, étant isolé, partage une variété de produits de viande, y compris la viande fraîche et celle conservée sous vide et fermentée (Holzapfel, 1998 ; Von Holy & Holzapfel, 1989). *Weissella* partage la même position systématique avec les deux genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* au sein de la famille

Leuconostocaceae, un petit nombre d'espèces est trouvé produire des substances inhibitrices contre divers pathogènes comprenant *E. coli*, *St. aureus*, *S. agalactiae*, et *Ca. albicans* (Pal & Ramana, 2010 ; Sriannual *et al.*, 2007 ; Lee, 2005). L'étude d'Al Atya, (2015) a examiné des souches d'*En. faecalis* envers *L. monocytogenes* ATCC 3512, *L. innocua* CIP 103982, *B. subtilis* ATCC 6633, *St. aureus* ATCC 33862 et Methicillin-resistant *St. aureus* (MRSA) et a dévoilé une action inhibitrice de 7.65 mm des surnageants contenant l'acide lactique et *bacteriocin like substances*, ces diamètres ont été nuls voire restreints à 6.5 mm lorsque les surnageants ont été neutralisés.

L'identification classique des microorganismes repose sur des tests physiologiques et biochimiques différemment exploités entre les chercheurs et les laboratoires (Clarridge, 2004). Elle s'avère insuffisante et non tranchante pour se prononcer sur l'identité espèce (Dušková *et al.*, 2012 ; Markiewicz *et al.*, 2010), et quoiqu'elle est souvent associée au traitement numérique au moyen des feuilles Excel API50 conçues pour cet effet, elle reste une piste plus ou moins limitée et toujours à étendre et à compléter par l'identification génétique. Cette dernière fait recours à diverses techniques moléculaires dont les plus couramment mises en œuvre sont : la 16S-ARDRA, la PCR, la RAPD, et l'hybridation ADN-ADN (Dušková *et al.*, 2012) jusqu'à la MALDI-TOF MS, récemment introduite et largement appliquée pour l'identification et le typage des microorganismes (Šedo *et al.*, 2011 ; Fenselau & Demirev, 2001).

3.6 Conclusion

En vue de la caractérisation antimicrobienne et phénétique, un nombre de départ de (201) isolats lactiques obtenus sur géloses MRS-Ac (pH 5.2) et MRS-VBC-V, a été criblé par les deux méthodes (*spot on the lawn* et *well diffusion assay*) dévoilant, ainsi, (157) isolats, équivalent de (97 %) ayant un pouvoir antibactérien et montrant des diamètres de 10 à 30 mm sur gélose MRS et limités à 26 mm sur TSA tamponnée. Leur classement a permis de tirer (30) isolats performants lors du test antibiotique envers (5) bactéries pathogènes (*B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212 et

L. ivanovii ATCC 19119, *Cl. perfringens* CECT 486). Après avoir être examinés par une batterie de tests, les isolats lactiques d'intérêt ont été identifiés au moyen des feuilles Excel API50 et agencés comme suit : neuf (9) isolats au genre *Lactobacillus* (LK6, 8, 11, 12, 26, 58, 59, 74, et LK 95), onze (11) isolats au genre *Aerococcus* (LK3, 10, 17, 18, 19, 56, 72, 81, 84 et LK94), sept (7) isolats au genre *Enterococcus* (LK42, 6, 47, 49, 50, 73, et LK88), deux (2) isolat au genre *Weisella* (LK16 et LK22), et un (1) isolat au genre *Tetragenococcus* (LK80) avec des tests de probabilité ; bon (ID : 0.5) et excellents (IDs : 0.800, 0.997, 0.990et 1.00). Cette identification phénétique s'avère insuffisante et non tranchante pour se prononcer sur l'identité précise, ce qui oblige le recours à l'approche polyphasique en complétant l'examen au moyen de techniques moléculaires (16S-ARDRA, PCR, l'hybridation, MALDI-TOF MS). Toutefois, de tels isolats dotés de pouvoir antimicrobien pourraient être des cultures bioprotectrices, starters ou probiotiques utiles comme des bio agents alimentaires et/ou bio thérapeutiques afin de prévenir ou traiter les maladies métaboliques et gastro-intestinales.

3.7 Références bibliographiques

- Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International journal of food microbiology*, 28(2), 169-185. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00055-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00055-0)
- Abid, A., & Khaled, M. B. (2018). Évaluation de la capacité antimicrobienne du microbiote lactique de la viande salée et séchée ; Khliia. Mémoire de Magister en Sciences Vétérinaires : Hygiène et qualité des aliments d'origine animale, Université Ibn Khaldoun, Tiaret.
- Adams, M. R., & Hall, C. J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology*, 23(3), 287-292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00581.x>
- Al Atya, A. K., Drider-Hadiouche, K., Ravallec, R., Silvain, A., Vachee, A., & Drider, D. (2015). Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Frontiers in Microbiology*, 6, 227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00227>
- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001-2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>

- Al-Allaf, M. A. H., Al-Rawi, A. M. M., & Al-Mola, A. T. (2009). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from minced beef meat against some pathogenic bacteria. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23(3).
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filioussis, G., Ambrosiadis, I., & Koidis, P. (2008). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation: purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(6), 448-454. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.05.007>
- Andersson, M. (1986). Evolution of condition-dependent sex ornaments and mating preferences: sexual selection based on viability differences. *Evolution*, 40(4), 804-816. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1986.tb00540.x>
- Atanassova, V., Meindl, A., & Ring, C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 105-113. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00479-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00479-2)
- Azevedo, P. O. D. S. D., Molinari, F., & Oliveira, R. P. D. S. (2018). Importance of the agar-media in the evaluation of bacteriocin activity against the same test-microorganisms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000117533>
- Benmechernene, Z., Fernández-No, I., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Kihal, M., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). Genomic and Proteomic Characterization of Bacteriocin-Producing *Leuconostoc mesenteroides* Strains Isolated from Raw Camel Milk in Two Southwest Algerian Arid Zones. *BioMed research international*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/853238>
- Benreguiég, M., Dalache, F., & Gacemi, B. (2013). Characterization of antibacterial activity and potential as probiotic of lactic acid bacteria isolated from goat's milk in Algeria. *Journal of Life Sciences*, 7(8), 802. <https://doi.org/10.17265/1934-7391/2013.08.004>
- Berry, L. L., Conant, J. S., & Parasuraman, A. (1991). A framework for conducting a services marketing audit. *Journal of the Academy of Marketing Science*, 19(3), 255-268. <https://doi.org/10.1007/BF02726500>
- Blom, M. A., van Twillert, M. G., de Vries, S. C., Engels, F., Finch, C. E., Veerhuis, R., & Eikelenboom, P. (1997). NSAIDS inhibit the IL-1 β -induced IL-6 release from human post-mortem astrocytes: the involvement of prostaglandin E2. *Brain research*, 777(1-2), 210-218. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01204-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01204-3)
- Boziaris, I. S., & Adams, M. R. (1999). Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International journal of food microbiology*, 53(2-3), 105-113. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00139-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00139-7)

- Booth, D. C., Crampin, S., Evans, R., & Roberts, G. (1985). Shear-wave polarizations near the North Anatolian Fault-I. Evidence for anisotropy-induced shear-wave splitting. *Geophysical Journal International*, 83(1), 61-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.1985.tb05156.x>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. (Eds.). (2005). *The Proteobacteria: Part A Introductory Essays*. Springer.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M., & Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International journal of food microbiology*, 104(3), 309-324. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.012>
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C. L., Delboni, R. R., & Oliveira, J. D. (2004). Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2), 137-144. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100023>
- Carasi, P., Díaz, M., Racedo, S. M., De Antoni, G., Urdaci, M. C., & Serradell, M. D. L. Á. (2014). Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/208974>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Chaskes, S., & Austin, R. (2015). Stains for light microscopy. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, Boca Raton, 45-60. <https://doi.org/10.1201/b17871-6>
- Chavasirikunton, V., Vatanyoopaisarn, S., & Phalakornkule, C. (2006). Bacteriocin-like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional thai fermented sausages. *Journal of Culture Collections*, 5(1), 64-72.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., & Håvarstein, L. S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of bacteriology*, 180(8), 1988-1994. <https://doi.org/10.1128/JB.180.8.1988-1994.1998>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>

- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, 83(4), 269-306. <https://doi.org/10.1051/lait:2003019>

- da Costa, R. J., Voloski, F. L., Mondadori, R. G., Duval, E. H., & Fiorentini, Â. M. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*, 2019 <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>

- Dal Bello, F. (2005). Ecological studies of the *Lactobacillus* biota in the human digestive tract and adaptation of intestinal lactobacilli to the sourdough ecosystem.

- De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., & Forestier, C. (2003). Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of clinical microbiology*, 41(3), 1270-1273. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1270-1273.2003>

- De Martinis, E. C., Públio, M. R., Santarosa, P. R., & Freitas, F. Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 32-37. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100008>

- De Roissart, H., & Luquet, F. M. (1994). *Bactéries lactiques. I & II, Lorica (Chemin de Saint Georges, F-38410, France)*, 1219.

- de Valdez, G. F. (2001). Maintenance of lactic acid bacteria. In *Food Microbiology Protocols* (pp. 163-171). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:163>

- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (pp. 91-142). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2668-1_3

- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, 16(9), 1058-1071. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>

- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, 16(9), 1058-1071. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>

- Devoyod, J. J., Millet, L., & Rousseau, M. (1985, September). Rôle de la vaisselle laitière dans les fabrications traditionnelles: cas des fromages à pâte pressée demi-dure. In *Histoire et Géographie des fromages. Actes du colloque «Géographie historique, Caen*.

- Diep, D. B., & Nes, I. F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current drug targets*, 3(2), 107-122. <https://doi.org/10.2174/1389450024605409>

- de Souza, J. V., & Dias, F. S. (2017). Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 13, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.003>
- Domínguez, M. C., de la Rosa, M., & Borobio, M. V. (2001). Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(4), 391-398. <https://doi.org/10.1093/jac/47.4.391>
- Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 349-356.
- Doyle, M. P., & Meng, J. I. A. N. G. H. O. N. G. (2006). Bacteria in food and beverage production. *Prokaryotes*. Springer, New York, 797-811. https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9_23
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 564-582. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-05>
- Drider, D., & Prevost, H. (Eds.). (2009). *Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles*. Economica.
- Drider, D., & Rebuffat, S. (Eds.). (2011). *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5>
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., & Chikindas, M. L. (2016). Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8(4), 177-182. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9223-0>
- Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International journal of food microbiology*, 159(2), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029>
- Elegado, F. B., Kim, W. J., & Kwon, D. Y. (1997). Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *International journal of food microbiology*, 37(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00037-8)
- Fenselau, C., & Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 20(4), 157-171. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*, 8(2), 44..

- Fleming, H. P., Etchells, J. L., & Costilow, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology*, 30(6), 1040-1042. <https://doi.org/10.1128/AEM.30.6.1040-1042.1975>
- Forouhandeh, H., Vahed, S. Z., Hejazi, M. S., Nahaei, M. R., & Dibavar, M. A. (2010). Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus* species from various dairy products. *Current Research in Bacteriology*, 3(2), 84-88. <https://doi.org/10.3923/crb.2010.84.88>
- Françoise, L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food microbiology*, 27(6), 698-709. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.016>
- Gaamouche, S., Arakrak, A., Bakkali, M., & Laglaoui, A. (2014). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(11), 657-666.
- Garzon, K., Ortega, C., & Tenea, G. N. (2017). Characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from native fruits of Ecuadorian Amazon. *Polish Journal of Microbiology*, 66(4), 473-481. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7037>
- Ghanbari, M., Rezaei, M., & Jami, M. (2013). Selection of *Lactobacillus* species from intestinal microbiota of fish for their potential use as biopreservatives. *Lactic acid bacteria-R&D for food, health and livestock purposes*. InTech, Rijeka, Cortia, 197-216. <https://doi.org/10.5772/50166>
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 C. *International journal of food microbiology*, 80(3), 251-259. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00171-X)
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in microbiology*, 161(6), 480-487. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>
- Goyal, B. M., Bansal, P., Gupta, V., Kumar, S., Singh, R., & Maithani, M. (2010). Pharmacological potential of *Boerhaavia diffusa*: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2(1), 17-22.
- GUESSAS, B. (2007). *Potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le Bio-contrôle de Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- Guessas, B., & Kihal, M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology*, 3(6), 339-342. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2062>
- Guiraud, J., & Galzy, P. (1980). *Analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. l'Usine Nouvelle.

- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>

- Hammi, I. (2016). *Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français* (Doctoral dissertation, Strasbourg).

- Hart, T., & Shears, P. (1997). Atlas de poche de microbiologie, éd. *Flammarion (Paris, France, 1997)*, 317.

- Hassan, Y. I., & Bullerman, L. B. (2008). Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 112-115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.038>

- HERNÁNDEZ-AQUINO, S. A. Ú. L., SIMÁN, E. D. J. M., MIRANDA-ROMERO, L. A., & ZUÑIGA, B. A. (2020). Meat Native Lactic Acid Bacteria Capable to Inhibit *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. *Biocontrol Science*, 25(2), 107-112. <https://doi.org/10.4265/bio.25.107>

- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, 41(2), 85-101. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00044-0)

- Hurst, A. (1981). Nisin. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 27, pp. 85-123). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70342-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70342-3)

- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2), 171-200. <https://doi.org/10.1128/MMBR.59.2.171-200.1995>

- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 525-532. <https://doi.org/10.1128/AEM.44.3.525-532.1982>

- Johnson M. *Statistical Analysis Software Programs in Biomedical Research*. *Mater Methods*. 2014 ;4 :1282. <https://doi.org/10.13070/mm.en.4.1282>

- Jones, R. J., Hussein, H. M., Zagorec, M., Brightwell, G., & Tagg, J. R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, 25(2), 228-234. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.11.001>

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90057-G](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90057-G)

- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 393-409. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.007>

- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90206-4](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90206-4)
- KUHLMANN, W. D. (2006). Buffer solutions.
- Kuhlmann, W. D., & Peschke, P. (2006). Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *International journal of experimental pathology*, 87(5), 343-359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00485.x>
- Larpent, J. P. (1997). Microbiologie des viandes. *JPK Larpent, Microbiologie Alimentaire, Technique de Laboratoire, Lavoisier, Paris*, 860-870.
- Larpent, J. P., & Larpent-Gourgau, M. (1990). *Mémento technique de Microbiologie*. Technique et documentation-Lavoisier.
- Larpent-Gourgau, M., Michaux, O., Larpent, J. P., Desmasure, N., Desmazeau, M., Mangin, I., ... & Tailliez, P. (1997). Les ferments lactiques et bactéries apparentées.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., & Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 634-640. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.634-640.2003>
- Lee, Y. (2005). Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. *FEMS Microbiology Letters*, 250(1), 157-162. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.009>
- Léonard, L. (2013). *Évaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique* (Doctoral dissertation, Dijon).
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., & Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 C. *International journal of food microbiology*, 39(1-2), 111-121. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00126-8)
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Lewus, C. B., Kaiser, A. L. A. N., & Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1683-1688. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.6.1683-1688.1991>
- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M. E., & Davidson, P. M. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. *Antimicrobials in food*, 659-680. <https://doi.org/10.1201/9781420028737.ch21>

- Markiewicz, L. H., Biedrzycka, E., Wasilewska, E., & Bielecka, M. (2010). Rapid molecular identification and characteristics of Lactobacillus strains. *Folia microbiologica*, 55(5), 481-488. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0080-z>
- Matilla-Sandholm, T., Mättö, J., & Saarela, M. (1999). LAB with health claim-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J*, 9, 25-35. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00041-2)
- Mechai, A., Debabza, M., & Kirane, D. (2014). Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *International Food Research Journal*, 21(6), 2451.
- McLeod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2008). Diversity of Lactobacillus sakei strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and applied microbiology*, 31(5), 393-403. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.002>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1320-1324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.005>
- Murua, A., Todorov, S. D., Vieira, A. D. S., Martinez, R. C. R., Cencič, A., & Franco, B. D. G. M. (2013). Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of Lactobacillus plantarum with potential beneficial properties from donkey milk. *Journal of applied microbiology*, 114(6), 1793-1809. <https://doi.org/10.1111/jam.12190>
- Muryany, I. M., Salwany, I. M., Ghazali, A. R., Hing, H. L., & Fadilah, N. R. (2017). Identification and characterization of the Lactic Acid Bacteria isolated from Malaysian fermented fish (Pekasam). *International Food Research Journal*, 24(2), 868.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., & Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1337-1345. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0020-8>
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Rouhani, S. M. R., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. In *Veterinary research forum* (Vol. 4, No. 3, p. 179). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Naidu, A. S., Unal, R., & Tulpinski, J. (2005). Bacteriocins: Antimicrobial Activity and Applications. In *Food Biotechnology* (pp. 1418-1465). CRC Press.

- Naimi, M., & Khaled, M. B. (2014 a). Isolation and Phenotypic Characterization of Lactobacillus Sakei and Pediococcus spp. Antagonists from Algerian Meat. *Global journal of science frontier research: C Biological Science*, 14(5), 21-25.
- Naimi, M., & Khaled, M. B. (2014 b). Exploratory Tests of Crude Bacteriocins from Autochthonous Lactic Acid Bacteria against Food-Borne Pathogens and Spoilage Bacteria Exploratory Tests of Crude Bacteriocins from Autochthonous Lactic Acid Bacteria against Food-Borne Pathogens and Spoilage Bact. *World Acad. Sci. Eng. Technol*, 8, 113-119.
- Naimi, S. (2018). Stabilité gastro-intestinale, activité antimicrobienne et impact sur le microbiote colique de la microcine J25: Approches métagénomiques et métabolomiques.
- Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A., & Zagorec, M. (2008). Method for reliable isolation of Lactobacillus sakei strains originating from Tunisian seafood and meat products. *International journal of food microbiology*, 121(3), 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.045>
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria* (Vol. 3, No. 2). Høst.
- Pal, A., & Ramana, K. V. (2010). Purification and characterization of bacteriocin from Weissella paramesenteroides DFR-8, an isolate from cucumber (Cucumis sativus). *Journal of food Biochemistry*, 34(5), 932-948. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00340.x>
- Piard, J. C., & Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*, 72(2), 113-142. <https://doi.org/10.1051/lait:199229>
- Pinto, A. L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., & Gibbs, P. A. (2009). Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International journal of food microbiology*, 129(1), 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.005>
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., & Koston, D. (2009). Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of Lactobacillus rhamnosus against some food spoilage microorganisms. *Annales UMCS, Biologia*, 64(1), 15-24. <https://doi.org/10.2478/v10067-010-0002-0>
- Pot, B., & Tsakalidou, E. (2009). Taxonomy and metabolism of Lactobacillus. *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics*, 1, 1-56.
- Pratush, A., Gupta, A., Kumar, A., & Vyas, G. (2012). Application of purified bacteriocin produced by Lactococcus lactis AP2 as food biopreservative in acidic foods. *Ann Food Sci Technol*, 13, 82-87.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., & Rangsiruji, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from

Thai fermented meat and fish products. *Food control*, 23(2), 547-551.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.029>

- Rebuffat, S. (2011). Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?. In *Prokaryotic antimicrobial peptides* (pp. 55-72). Springer, New York, NY.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_4
- Reid, G., Jass, J., Sebulsy, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 658-672.
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.658-672.2003>
- Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R., ... & Klaenhammer, T. R. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, 37(2), 105-118. <https://doi.org/10.1097/00004836-200308000-00004>
- Reinberg, E. (2015). Étude in vitro de la stabilité gastro-intestinale et de l'activité biologique de la microcine J25: impact sur l'équilibre du microbiote colique et activité inhibitrice contre *Salmonella enteritidis*.
- Remiger, A., Eijsink, V. G. H., Ehrmann, M. A., Sletten, K., Nes, L. F., & Vogel, R. F. (1999). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25 a and 1.25 b, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 1053-1058. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00792.x>
- Reuter, G. (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2(1-2), 55-68. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90057-1)
- Rijkers, G. T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., ... & Rabot, S. (2010). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *The Journal of nutrition*, 140(3), 671S-676S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.113779>
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., & Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10(1-2), 7-15. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00017-0)
- Ruiz, P. A., Philbrick, C. R., Zak, E., Cheung, K. W., & Sauer, P. W. (2009). Uncertainty management in the unit commitment problem. *IEEE Transactions on Power Systems*, 24(2), 642-651. <https://doi.org/10.1109/TPWRS.2008.2012180>
- Rukure, G., & Bester, B. H. (2001). Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. *Food Control*, 12(1), 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00016-5](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00016-5)

- Saito, S., Kobayashi, M., Kimoto-Nira, H., Aoki, R., Mizumachi, K., Miyata, S., ... & Suzuki, C. (2011). Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR. *FEMS microbiology letters*, 316(1), 70-76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02193.x>
- Samot, J. (2012). *Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux* (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2)).
- Savadogo, A., Ouattara, A. C., Bassole, H. I., & Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*, 5(9).
- Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2003). Culture media for lactic acid bacteria. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 37, pp. 127-140). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80011-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80011-5)
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiology*, 4(3), 199-208. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(87\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0740-0020(87)90002-5)
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1901-1906. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.8.1901-1906.1989>
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (Eds.). (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Crc Press. <https://doi.org/10.1201/9781420014495>
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., & Heller, K. J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 448-457. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.019>
- Šedo, O., Sedláček, I., & Zdráhal, Z. (2011). Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass spectrometry reviews*, 30(3), 417-434. <https://doi.org/10.1002/mas.20287>
- Shylaja, R., Selvakumar, D., & Jagannath, J. H. (2010). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. *Recent Research in Science and Technology*, 2(6), 42-46.
- Smith, J. L., & PALUMBO, S. A. (1983). Use of starter cultures in meats. *Journal of Food Protection*, 46(11), 997-1006. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.11.997>
- Soumya, T. V., Reshma, J., & Surya, J. (2012). Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus* sp and Optimization of Cultural Conditions. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(12), 1-9.

- Sriornual, S., Yanagida, F., Lin, L. H., Hsiao, K. N., & Chen, Y. S. (2007). Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaa-som, a fermented fish product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2247-2250. <https://doi.org/10.1128/AEM.02484-06>
- Strus, M., Brzychczy-Włoch, M., Gosiewski, T., Kochan, P., & Heczko, P. B. (2006). The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(1), 56-63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00120.x>
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*, 40(3), 722. <https://doi.org/10.1128/MMBR.40.3.722-756.1976>
- Tagg, J., & McGiven, A. (1971). Assay system for bacteriocins. *Applied microbiology*, 21(5), 943. <https://doi.org/10.1128/AEM.21.5.943-943.1971>
- Tailliez, P. (2001). Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le lait*, 81(1-2), 1-11. <https://doi.org/10.1051/lait:2001101>
- Tenea, G. N., & Yépez, L. (2016). Bioactive compounds of lactic acid bacteria. Case study: Evaluation of antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactobacilli isolated from native ecological niches of Ecuador. *Probiotics and prebiotics in Human Nutrition and Health*, 149-167. <https://doi.org/10.5772/63112>
- Thomas, P., Sekhar, A. C., Upreti, R., Mujawar, M. M., & Pasha, S. S. (2015). Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>
- Todorov, S. D., Furtado, D. N., Saad, S. M. I., Tome, E., & Franco, B. D. G. M. (2011). Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 971-986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04950.x>
- Tomás, M. S. J., Bru, E., Wiese, B., & Nader-Macías, M. E. F. (2010). Optimization of low-cost culture media for the production of biomass and bacteriocin by a Urogenital *Lactobacillus salivarius* strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 2-11. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9037-4>
- TV, S., John, R., & Jose, S. (2012). Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus* SP and Optimization of Cultural Conditions. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 503.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International*

journal of food microbiology, 96(2), 149-164.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.016>

- Vizioli, J., & Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides versus parasitic infections?. *Trends in parasitology*, 18(11), 475-476. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02428-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02428-5)
- Vollenweider, S., & Lacroix, C. (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(1), 16-27. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1497-y>
- Von Holy, A., & Holzappel, W. H. (1989, July). Spoilage of vacuum packaged processed meats by lactic acid bacteria, and economic consequences. In *Proceeding of the 10 th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists* (pp. 185-190).
- Von Wright, A., & Axelsson, L. (2012). Lactic acid bacteria: an introduction. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*, 4, 1-16. <https://doi.org/10.1201/b11503-2>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Yang, Z. (2000). *Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties*. Z. Yang.
- Yerlikaya, O. (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology*, 34(2), 221-229. <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0050>
- Zacharof, M. P., Coss, G. M., Mandale, S. J., & Lovitt, R. W. (2013). Separation of lactobacilli bacteriocins from fermented broths using membranes. *Process Biochemistry*, 48(8), 1252-1261. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.05.017>

Chapitre 4

Evaluation probiotique des genres lactiques *Aerococcus spp.*, *Enterococcus spp.* et *Weisella sp.* de *Guedid*

4.1	Résumé	100
4.2	Introduction	101
4.3	Matériel et méthodes	120
4.4	Résultats	130
4.5	Discussion	143
4.6	Conclusion	153
4.7	Références bibliographiques	153

4.1 Résumé

Cette troisième et dernière partie de la recherche s'est intéressée à l'étude du potentiel probiotique et technologique d'isolats lactiques élus lors de la deuxième partie grâce à leur capacité anti microbienne. Lors du criblage entamé par le suivi cinétique de la croissance (DO, pH, production et quantification de l'agent inhibiteur), les surnageants bruts neutralisés d'*Aerococcus spp.* (Lbm19, 18, 3) et *Enterococcus sp.* (Lbm49, 46, 50) ont montré une zone d'inhibition de 9 mm contre *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923 et *L. ivanovii* ATCC 19119 et à degré moindre contre *Cl. perfringens* CECT 486. Le pic antagoniste a été obtenu à la phase stationnaire où le pH 3.5 a été atteint. Les surnageants étaient sensibles à l'action de la pepsine, l' α -chymotrypsine et à la chaleur. Tous les candidats ont montré une capacité de digestion pour les protéines (2 % du lait écrémé) mais pas pour l'amidon (2 %) et les lipides (1 % et 3 % du tween 80). Certains isolats ont présenté des résultats positifs pour les EPS (10 % du saccharose) et d'avantage pour l'acétoïne. Tous les candidats ont montré une thermo-sensibilité (60 °C/30min). La viabilité des candidats a été réduite de 1 à 2 unités log (UFC/mL) dans les conditions gastro-intestinales, pH 2 et pH 3. Le taux d'assimilation du cholestérol a atteint les 89 %. Les candidats ont été négatifs à la gélatine (3 %), les sels biliaires (0.5 %), et n'ont pas montré une activité hémolytique (5 % du sang). Tous les candidats ont été quasiment sensibles aux antibiotiques (0.72 à 0.90) hormis la vancomycine et le sulfaprim. Par probation, *Enterococcus sp.* Lbm49, *Aerococcus sp.* Lbm19, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46 et *Aerococcus sp.* Lbm3 étaient élus pour prometteurs en matière du potentiel probiotique, néanmoins, cette étude devrait être complétée par une caractérisation moléculaire, des tests *ex vivo* et *in vivo*.

Mots clés : *Guedid*, probiotique, bactéries lactiques, criblage.

4.2 Introduction

L'intérêt croissant pour les aliments fonctionnels bio à base de céréales, de fruits et légumes, et d'autres produits, d'un côté, et d'un autre, le risque que présentent les microorganismes pathogènes et les agents de conservation alimentaires de synthèse chimique sur la santé du consommateur, la préoccupation des acteurs de santé et des industriels est penchée vers le screening, le développement et l'adoption des agents de lutte biologique, nouveaux, naturels et sains recherchés, le plus souvent, dans les biotopes alimentaires et les environnements naturels. Les agents de garde alimentaire potentiels comprennent ; les bactériophages, les bactériocines, les sidérophores, le QS, divers métabolites primaires et secondaires, ainsi que les bactéries et Levures probiotiques de première et deuxième génération (McIntyre *et al.*, 2012 ; Vinderola, 2008). De plus, les probiotiques à base de matières végétales sont aussi au cœur des produits alimentaires fonctionnels bio (Vera-Pingitore *et al.*, 2016 ; Mridula & Sharma, 2015). De nombreuses investigations plaident pour l'importance des probiotiques comme compléments alimentaires au profit de la santé humaine et animale en fournissant une barrière naturelle, sûre et efficace notamment contre les infections microbiennes (Angmo *et al.*, 2016 ; Oh & Jung, 2015), et leur rôle dans le traitement des désordres gastro-intestinaux et immunologiques (Dubey & Jeevaratnam, 2015). S'ajoute à cela, un intérêt considérable pour l'utilisation de certains probiotiques et d'acides organiques comme alternatives à l'utilisation d'antibiotiques dans les aliments et pour gérer les diverses infections bactériennes et fongiques du tube digestif chez l'homme et l'animal et éluder ainsi le problème de l'antibiorésistance venant de jour en jour entraver l'efficacité des antibiotiques à usage courant (Dubey & Jeevaratnam, 2015 ; Musikasang *et al.*, 2009 ; Shin *et al.*, 2008 ; Guerra *et al.*, 2007).

Bien que dans le passé, la sélection des probiotiques préconise l'origine humaine comme critère, essentiellement, le tube digestif car ces souches seraient mieux adaptées pour coloniser le tractus gastro-intestinal (Tokatli *et al.*, 2015 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012 ; Tambekar & Bhutada, 2010), récemment les aliments fermentés traditionnels contiennent profusément de microorganismes aux caractéristiques probiotiques, particulièrement les bactéries lactiques, étudiés pour leur potentiel probiotique et leur capacité à produire des substances importantes pour les aliments et les préparations pharmaceutiques (Liu *et al.*, 2018 ; Ng *et al.*, 2016 ; Tokatli *et al.*,

2015 ; Oh & Jung, 2015 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012 ; Pinto *et al.*, 2006 ; Sanni *et al.*, 2002). Toutefois, le comité expert mixte FAO/OMS, (2002) a suggéré que la spécificité de l'action probiotique est plus importante que la source du microorganisme. En fait, à côté d'une large gamme d'aliments fonctionnels probiotiques, diverses préparations probiotiques sont disponibles sur le marché, dont la plupart sont produites par l'industrie laitière, sous forme de capsules, de liquide, de gel ou de poudre. Les préparations probiotiques disponibles dans le commerce comprennent ; *Lactobacillus* seul (*Lactiflora*[™], *LactoBacil*[™], *Lactocap*[™], *Lactovit*[™], *Sporlac*[™]) ou en combinaison avec *Streptococcus* (*Lacticin*[™]) ou *Saccharomyces* (*Laviest*[™]) (Dubey & Jeevaratnam 2015 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012 ; Tambekar & Bhutada, 2010). La quasi-totalité des microorganismes probiotiques, utilisés dans les produits commerciaux, appartient aux membres des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Néanmoins, les souches de bactéries lactiques sont les plus couramment utilisées comme probiotiques. Plusieurs produits à base de probiotiques sont déjà commercialisés pour usage en aviculture, tels que *Aviguard*[™], *Primalac*[™] et *Interbac*[™] (Chambers & Gong, 2011), ils agissent en compétition avec le pathogène, en stimulant la production d'anticorps et/ou en augmentant la production de mucine et la croissance des villosités intestinales. L'efficacité des probiotiques comme facteurs de croissance a été démontrée dans plusieurs travaux (Reinberg, 2015 ; Gaggia *et al.*, 2010).

Hippocrate, avait conçu pour la première fois, il y a des milliers d'années, l'idée que la nourriture pouvait servir de médicament : "*Que la nourriture soit ton médicament, et que le médicament soit ton nourriture*". Au cours des dernières années, le concept d'aliments à valeur médicinale a réapparu en tant qu'aliments fonctionnels (aliments) (Harzallah & Belhadj, 2013). L'apparition du concept probiotique remonte au 1907 suite à l'observation du biologiste russe Elie Metchnikoff (lauréat du prix Nobel de médecine et physiologie) établissant un lien entre la longévité de certaines Bulgares et leur grande consommation de produits laitiers fermentés, faisant ainsi, l'isolement et l'identification de deux souches : *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus*. Par conséquent, Metchnikoff fut ainsi le premier à suggérer que la consommation des bactéries lactiques présentes dans ces laits fermentés pourrait avoir des effets bénéfiques sur la santé (Naimi, 2018 ; Samot & Badet, 2013 ; Anukam & Reid, 2007). Le terme probiotique (*Pro* et *Bios*) dérive du latin et du grec, signifiant (en faveur de la vie) est utilisé pour la première fois par Kollath, (1953) comme

un anonymat du mot antibiotique pour décrire la restauration de la santé des patients souffrant de malnutrition par différents suppléments organiques et inorganiques (Hossain *et al.*, 2017). Plus tard, Vergin, (1954) a proposé que le déséquilibre microbien dans le corps causé par un traitement antibiotique aurait pu être rétabli par une alimentation riche en probiotiques ; une suggestion citée par beaucoup comme la première référence aux probiotiques tels qu'ils sont définis de nos jours. De même, Kolb a reconnu les effets néfastes de l'antibiothérapie et a proposé la prévention par les probiotiques (Vasiljevic & Shah, 2008). Ultérieurement, Lilly & Stilwell, (1965) ont introduit ces microorganismes comme des probiotiques et les ont définis comme des substances sécrétées par un organisme qui stimulent la croissance d'un autre. Parker, cependant, désigna les probiotiques comme des organismes et des substances qui contribuent à l'équilibre microbiologique (Anukam & Reid, 2007). Puis, Fuller, (1989) propose une définition disant qu'ils représentent un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale.

Récemment, le groupe de travail mixte de la FAO/OMS, (2002) a défini les probiotiques comme suit : « *des microorganismes vivants, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent un avantage sanitaire à l'hôte* », une définition qui demeure la plus acceptée et utilisée (Hill *et al.*, 2014 ; Harzallah & Belhadj, 2013 ; Sanders, 2008 ; Schrezenmeir & De Vrese, 2001). Cette définition reflète le fait que les probiotiques ciblent non seulement l'intestin mais aussi la cavité buccale, le nasopharynx, l'estomac, le vagin, la vessie et la peau (Reid, 2005). Ce groupe de travail a reconnu que les probiotiques doivent être capables d'exercer des prestations de santé sur l'hôte grâce à la croissance et/ou l'activité dans le corps humain (Leahy *et al.*, 2005). Cette dernière définition est élargie par l'ISAPP (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*) pour définir le probiotique comme « *un organisme vivant, qui fournit un avantage à l'hôte lorsqu'il est fourni en quantité adéquate* » (de Oliveira, 2018 ; Gasbarrini *et al.*, 2016). Cependant, des recherches récentes suggèrent que ce ne sont pas seulement les microorganismes vivants mais aussi leurs formes mortes et certains composants des parois cellulaires des microorganismes qui sont susceptibles d'influencer l'hôte (KOHAJDOVÁ *et al.*, 2006 ; Salminen *et al.*, 1998 ; Ziemer *et al.*, 1998). Un probiotique peut être associé en même temps à son substrat prébiotique et ce mélange est alors appelé symbiotique, cela va permettre d'assurer la survie et la persistance du

probiotique dans le microbiote digestif. Ainsi, un prébiotique est défini comme « *des ingrédients alimentaires qui influencent de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens dans le colon et qui améliorent ainsi la santé de l'hôte* » (Bultel, 2017). Les probiotiques se composent de divers types de microorganismes qui améliorent le microbiote intestinal et affectent à la fois la microflore locale en sécrétant des enzymes bénéfiques, acides organiques, vitamines et substances antibactériennes non toxiques. Ces microorganismes probiotiques peuvent être sous différents types de produits, y compris les aliments, les substances médicamenteuses et les suppléments alimentaires (Harzallah & Belhadj, 2013 ; Naimi, 2018). En ce qui concerne les aliments, les probiotiques sont considérés comme des préparations viables dans les aliments ou les compléments alimentaires, selon ces propos, un nombre impressionnant d'espèces microbiennes est considéré comme des probiotiques (Holzapfel *et al.*, 2001).

L'introduction des microorganismes probiotiques à l'hôte se fait souvent par le biais de la consommation d'aliments fermentés, sinon sous forme de produits alimentaires enrichis ou de produits pharmaceutiques, et en raison de l'attitude générale des consommateurs citoyens Européens contre les médicaments, les microorganismes probiotiques sont principalement consommés dans les produits alimentaires, principalement sous forme de laits fermentés (Yerlikaya, 2014). Pour que les probiotiques remplissent les bienfaits attendus, il est requis que les probiotiques doivent être viables et présents en grand nombre au moment de la consommation (Muller *et al.*, 2013 ; Vinderola *et al.*, 2011). Certains auteurs citent que généralement 6 à 7 unités log (UFC) par millilitre ou gramme d'aliment de microorganismes probiotiques sont recommandés afin d'exercer un bienfait pour la santé (Angmo, *et al.*, 2015 ; Ashraf & Shah, 2011 ; Champagne *et al.*, 2011 ; Lahtinen *et al.*, 2010). Lors des essais cliniques randomisés (ECR), des résultats significatifs sont associés à des doses comprises entre 10^9 et 10^{10} UFC/dose de produits probiotiques, et de ce fait la dose minimale efficace recommandée doit être 10^8 UFC/dose (Vera-Pingitore *et al.*, 2016 ; Naidu *et al.*, 2012 ; WGO, 2008 ; Reid, 2006). La dose probiotique doit être basée sur les niveaux qui se sont révélés efficaces lors d'études chez l'homme. Cependant, une dose ne peut être considérée comme efficace pour toutes les souches (Sanders, 2008).

Actuellement, le groupe probiotique le plus courant est celui des bactéries lactiques, et les espèces couramment utilisées appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les espèces appartenant aux genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, sont également considérées comme des microorganismes probiotiques. D'autres microorganismes sont également retenus, il s'agit de *Bacillus*, *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*), *Aspergillus* et quelques Levures (*Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* et *Candida*) (Figure 4.1) (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Naimi, 2018 ; Hossain *et al.*, 2017 ; de Souza *et al.*, 2017 ; Ashraf *et al.*, 2016 ; Vera-Pingitore *et al.*, 2016 ; Tokatli *et al.*, 2015 ; Harzallah & Belhadj, 2013 ; Musikasang *et al.*, 2009). Les bactéries lactiques, et en tant que composants majeurs de la microflore à la fois des mammifères sains et des aliments, ont été les plus étudiées en tant que candidats pour l'amélioration du microbiote compétitive bio protectrice (McIntyre *et al.*, 2012). Les bactéries lactiques à activité probiotique sont généralement des flores entériques et sont censées jouer un rôle bénéfique dans l'écosystème du tractus gastro-intestinal, et les espèces appartenant à ce groupe sont fréquemment utilisées à grande échelle dans la production et la conservation de nombreux aliments ou comme probiotiques pour l'homme et les animaux. Elles ont la capacité de produire un certain nombre de substances souhaitables qui peuvent inhiber les microbes pathogènes, augmenter la durée de conservation et l'innocuité des aliments (poissons, fruits de mer, volaille, produits laitiers, viandes, viandes hachées, légumes, etc.) et améliorer la saveur, la texture, et la valeur nutritionnelle (McIntyre *et al.*, 2012).

Le genre *Lactobacillus* comprend des dizaines d'espèces qui dominent le tube digestif des mammifères notamment *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. satsumensis*, *Lb. johnsonii*, *Lb. helveticus* et *Lb. salivarius*, appliquées dans plusieurs procédés industriels afin de produire des conservateurs, des acidulants et des arômes alimentaires, mais aussi exploitées dans la fabrication de médicaments et de produits cosmétiques ainsi que dans la fabrication de polymères d'acide polylactique (Musikasang *et al.*, 2009 ; Konig & Frohlich, 2009 ; Hyronimus *et al.*, 2000 ; Fuller 1989).

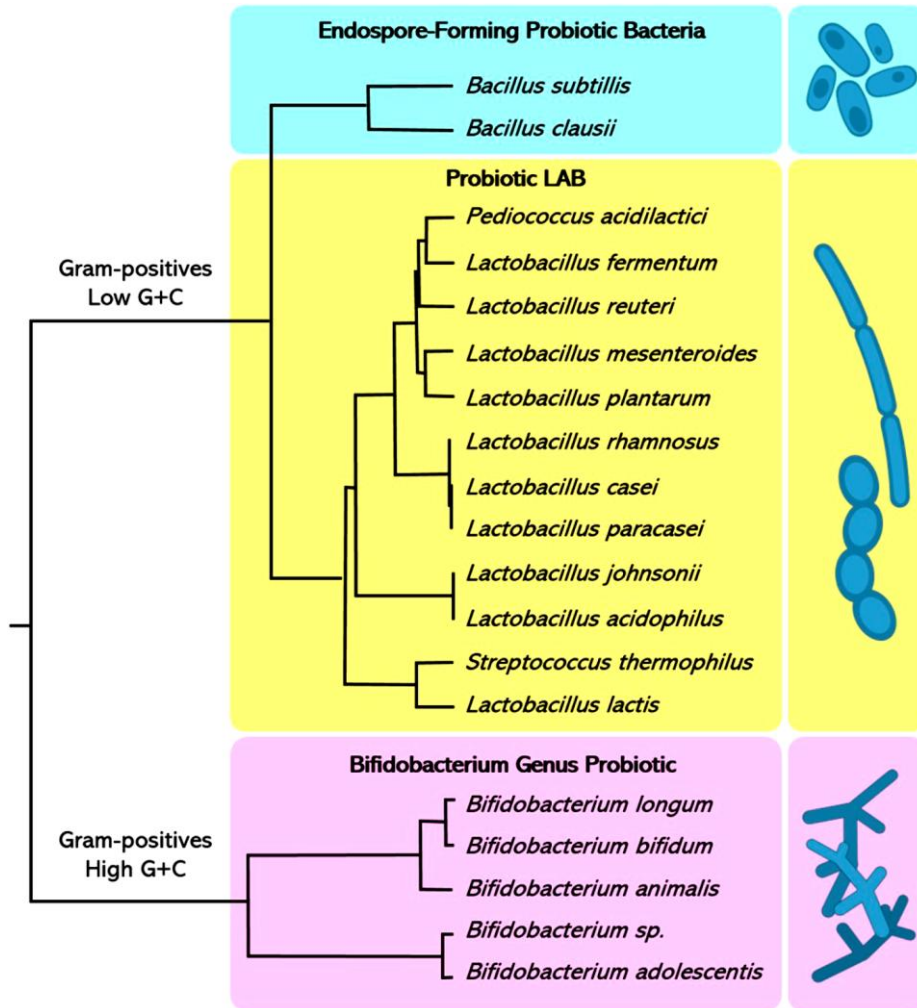


Figure 4.1 : Arbre phylogénétique des différents groupes bactériens probiotiques (de Melo Pereira *et al.*, 2018)

Quant aux espèces de *Bifidobacterium* à savoir *Bf. adolescentis*, *Bf. animalis*, *Bf. bifidum*, *Bf. breve* et *Bf. longum*, elles ont été reconnues pour divers effets bénéfiques et font les probiotiques des yaourts, des laits, des fromages et d'autres produits laitiers (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; McIntyre *et al.*, 2012 ; Russell *et al.*, 2011 ; Picard *et al.*, 2005).

Bien que le nom de *Bacillus* renvoie le caractère pathogène, ses espèces notamment *B. clausii* et *B. subtilis* sont utilisées comme probiotiques dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Liu

et al., 2018 ; de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Ripert *et al.*, 2016). La principale caractéristique de ce groupe est la formation d'endospores permettant le maintien de la viabilité pendant de longues périodes de conservation (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Cutting, 2011).

En ce qui concerne les Levures, leur teneur élevée en protéines, en vitamine B, en minéraux et en divers composés immunostimulants (protéases, β -glucanes et oligosaccharides de mannane) a attiré l'attention pour l'utilisation probiotique (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Arévalo-Villena *et al.*, 2018. ; Fadda *et al.*, 2017; Gil-Rodríguez *et al.*, 2015). Ce groupe de probiotiques a l'avantage de l'indifférence aux antibiotiques et de la tolérance aux traitements technologiques comme la lyophilisation et la pasteurisation (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Abdel-Rahman *et al.*, 2013 ; Morgunov *et al.*, 2013).

Concernant le genre *Enterococcus*, bien que certaines de ses souches sont redoutables, les Entérocoques sont de plus en plus étudiés comme candidats probiotiques potentiels, avec une application réussie d'*En. faecium* SF68R et d'*En. Faecalis* Symbioflor-1 pour le traitement de la diarrhée chez les chiens et les chats (Bybee *et al.*, 2011). D'autres souches sont également utilisées pour prévenir ou traiter la diarrhée chez les volailles, les bovins et d'autres animaux domestiques (Franz *et al.*, 2011). De même, la souche *En. durans* M4-5 produisait du butyrate, un produit métabolique induisant des effets anti-inflammatoires et aide à la préservation de l'intégrité de l'épithélium intestinal (Raz *et al.*, 2007 ; Avram-Hananel *et al.*, 2010). Les Entérocoques probiotiques sont utilisés comme compléments alimentaires sous forme de préparations pharmaceutiques plutôt que de cultures starters dans les aliments (Moreno *et al.*, 2006). Également, de nombreuses bactériocines ont été isolées et génétiquement caractérisées principalement à partir d'*En. faecalis* et d'*En. faecium*. Un certain nombre de ces peptides appartient au groupe des bactériocines de type pédiocine (classe IIa) et partageant un puissant effet anti-*Listeria*, tels que la mundicine L et l'entérocline L50 A et B appartenant à des entéroclines synthétisées sans peptide leader (classe IIb) (Hanchi *et al.*, 2014 ; Feng *et al.*, 2009 ; Franz *et al.*, 2007).

Les bienfaits des microorganismes probiotiques pour la santé est fonction des souches probiotiques et du contexte dans lequel elles sont utilisées (Gasbarrini *et al.*, 2016 ; Cicienia *et al.*,

2014). Les bienfaits des probiotiques comprennent des effets bénéfiques sur la prévention de la diarrhée, des maladies inflammatoires de l'intestin, des infections uro-génitales, de la diminution du taux sérique du cholestérol, du cancer du côlon, la régulation de l'équilibre microbien du microbiote intestinal, la prévention et la réduction des allergies, l'amélioration et la stimulation du système immunitaire, la biodisponibilité et l'absorption des nutriments (calcium), la promotion de la digestion (lactose), l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes et diminution du recours aux antibiotiques (Hossain *et al.*, 2017 ; Ng *et al.*, 2016 ; Angmo *et al.*, 2015 ; Tokatlı *et al.*, 2015 ; Harzallah & Belhadj, 2013). De nouvelles preuves soutiennent le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement d'autres maladies, telles que la fibrose kystique, divers cancers, les caries dentaires, les maladies parodontales et la mauvaise odeur buccale (Hossain *et al.*, 2017 ; Kaur *et al.*, 2015) et des activités anti dépressives et anxiolytiques (de Melo Pereira *et al.*, 2018). La liste des avantages pour la santé liés aux aliments fonctionnels ne cesse de s'allonger et l'intestin reste la cible évidente pour le développement d'aliments fonctionnels bio, car il sert d'interface entre le régime alimentaire et toutes les autres fonctions du corps (Harzallah & Belhadj, 2013).

Les microorganismes probiotiques possèdent la capacité de résister aux enzymes salivaires, aux pHs bas et au suc pancréatique, de coloniser les cellules épithéliales intestinales en régulant le microbiote et en exerçant des fonctions biologiques (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Zoumpoulou *et al.*, 2017). Comme établi par la FAO/OMS, (2002) les principaux tests *in vitro* actuellement utilisés pour l'étude des souches candidates probiotiques sont : la tolérance à l'acidité gastrique et aux acides biliaries, l'adhérence au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines et aux lignées cellulaires, l'activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes, la capacité à réduire l'adhésion de l'agent pathogène aux surfaces, l'activité hydrolase des sels biliaries et la résistance aux spermicides, ce dernier critère est pour les probiotiques à usage vaginal (Tableau 4.1) (Tokatlı *et al.*, 2015). D'autres critères sont clés et souhaitables lors de la sélection des probiotiques pour les applications alimentaires (Tableau 4.2) (Harzallah & Belhadj, 2013 ; Vasiljevic & Shah, 2008).

Les mécanismes d'action des probiotiques varient d'une souche à une autre, ce qui rend l'investigation du mécanisme responsable très difficile et complexe, qui constitue dans la plupart

des cas une combinaison d'activités (Hossain *et al.*, 2017 ; Angmo *et al.*, 2015 ; Harzallah & Belhadj, 2013). Généralement, les probiotiques peuvent influencer la santé humaine par trois niveaux d'action distincts : (i) interaction avec les microorganismes présents sur le site d'action, (ii) renforcement des barrières muqueuses et (iii) modulation du système immunitaire de l'hôte tout en stimulant la composition, le développement et l'activité d'un microbiote intestinal sain et dominé par des bactéries bénéfiques (Figure 4.3) (Vera-Pingitore *et al.*, 2016 ; Wan *et al.*, 2016 ; Reinberg, 2015 ; Harzallah & Belhadj, 2013 ; McIntyre *et al.*, 2012 ; FAO/OMS, 2002).

Ces mécanismes reposent soit sur la production de nombreux types de molécules, soit sur le contact direct cellule à cellule (Hossain *et al.*, 2017 ; Jonkers, 2016). Une grande variété d'effets bénéfiques potentiels sur la santé a été attribuée aux probiotiques allant du soulagement de la diarrhée infantile et la constipation à la prévention des principales maladies potentiellement mortelles (Harzallah & Belhadj, 2013). Outre le mécanisme d'action, les microorganismes probiotiques doivent pratiquement avoir les caractéristiques suivantes : (i) la capacité d'envahir l'intestin, (ii) une vitesse de croissance spécifique élevée et de faibles besoins nutritionnels, (iii) la capacité de réprimer les pathogènes entériques, (iv) une culture facile dans des conditions industrielles, et (v) la capacité de survivre aux processus de fabrication afin de maintenir son activité dans l'aliment (Reinberg, 2015 ; Chambers & Gong, 2011).

L'activité anti-pathogène est de plus en plus considérée comme un critère fonctionnel carrefour dans la sélection d'une souche probiotique (Hanchi *et al.*, 2014 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012 ; Musikasang *et al.*, 2009). Cette activité confère le pouvoir protectif aux bactéries lactiques en inhibant la croissance des bactéries pathogènes (gram positif et gram négatif), ainsi que les Levures et Moisissures et permet à cet effet de prolonger la durée de conservation par production de bactériocines durant le métabolisme fermentaire, mais aussi d'autres produits tel que les d'acides organiques, le diacétyl et le H₂O₂ (de Souza *et al.*, 2017 ; Harzallah & Belhadj, 2013 ; McIntyre *et al.*, 2012 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012).

Tableau 4.1 : Critères de sélection des probiotiques (FAO/OMS, 2002)

Critères de sélection
Résistance à l'acidité gastrique
Résistance aux acides biliaires
Adhérence au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines et aux lignées cellulaires
Activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes
Capacité à réduire l'adhésion de l'agent pathogène aux surfaces
Activité hydrolase des sels biliaires (BSH)
Résistance aux spermicides

Critères sécuritaires	<ul style="list-style-type: none"> - Origine - Pathogénie & infectiosité - Virulence, toxicité, activité métabolique et propriétés intrinsèques (tolérance aux antibiotiques)
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilité (du phénotype et du génotype, y compris la stabilité des plasmides) - Viabilité souhaitée pendant le traitement et le stockage - Bonnes propriétés sensorielles - Résistance aux phages - Production à grande échelle
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> - Tolérance à l'acide gastrique et aux jus - Tolérance à la bile - Adhérence à la surface de la muqueuse - Bienfaits prouvés et validés et documentés
Critères physiologiques désirables	<ul style="list-style-type: none"> - Immuno-modulation - Activité antagoniste envers des agents pathogènes gastro-intestinaux, à savoir <i>Helicobacter pylori</i>, <i>Ca. albicans</i> - Métabolisme du cholestérol - Métabolisme du lactose - Propriétés anti mutagène et anti cancérogène

Figure 4.2 : Critères clés et souhaitables de sélection des probiotiques pour applications alimentaires (Harzallah & Belhadj, 2013 ; Vasiljevic & Shah, 2008)

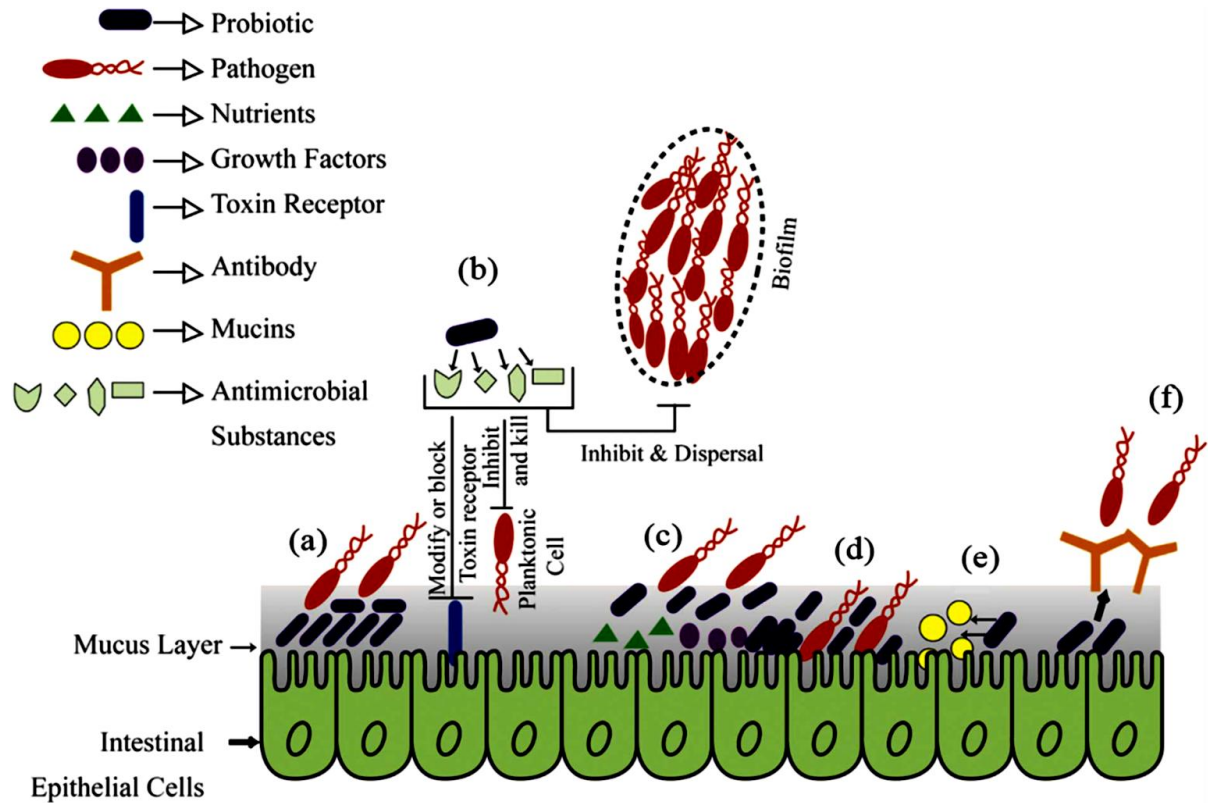


Figure 4.3 : Mécanismes d'action des probiotiques à l'intérieur de l'intestin
 (a) exclusion compétitive des pathogènes, (b) production de substances antimicrobiennes, (c) concurrence pour les nutriments et les facteurs de croissance, (d) augmentation de l'adhérence à la muqueuse intestinale, (e) fonction de barrière épithéliale améliorée, (f) stimulation immunitaire (sécrétion d'Ig A améliorée) (Hossain *et al.*, 2017)

Les souches probiotiques peuvent également sécréter des EPS qui peuvent rivaliser la formation de biofilms pathogènes (Kim *et al.*, 2009). En plus de l'effet protecteur, ces métabolites, dans leur ensemble, ont des effets bénéfiques sur la couleur, la texture, l'odeur et le goût des aliments (de Souza *et al.*, 2017). Également, les bio surfactants sécrétés par les probiotiques peuvent inhiber la croissance de bactéries pathogènes (Hossain *et al.*, 2017 ; Kanmani *et al.*, 2013 ; Ruiz-Zarzuela *et al.*, 2004). De plus, les souches probiotiques peuvent être sélectionnées en raison de leur capacité à inhiber la croissance de bactéries pathogènes (*Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* et *E. coli*) qui présentent une activité élevée d'enzymes responsables de la synthèse de composés cancérigènes (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; de Souza *et al.*, 2017). L'activité anti-pathogène via la sécrétion des métabolites antimicrobiens est évaluée sur géloses par recherche des zones d'inhibition (Divya *et*

al., 2012 ; Cueva *et al.*, 2010), alors que l'activité compétitive est évaluée par mesure de l'adhésion aux microbes pathogènes (Inturri *et al.*, 2016). Pour cette dernière, la co-agrégation est le test utilisé pour mesurer l'agglomération des probiotiques avec différents agents pathogènes, notamment *E. coli*, *St. aureus*, *Candida spp.*, *L. monocytogenes* et *Sa. choleraesuis* (Vidhyasagar & Jeevaratnam, 2013 ; Soleimani *et al.*, 2010).

Les exigences de base pour une souche pouvant servir de probiotique incluent la tolérance à l'acide et à la bile, la capacité à s'adhérer à l'épithélium intestinal et la viabilité pendant le traitement et le stockage (Musikasang *et al.*, 2009). Les microorganismes probiotiques doivent être viables au moment de l'ingestion, survivre le transit gastro-intestinal et coloniser l'épithélium (l'endroit où ils sont présumés agir). Une variété de traits pertinents définit la capacité de tolérance au stress gastro-intestinal, dont le plus important est la tolérance à la fois aux conditions hautement acides régnant dans le sac gastrique (pH bas, suc gastrique et pepsine) et aux concentrations de pancréatine et de sels biliaires présents dans l'intestin grêle, ainsi qu'à la température corporelle interne (Monteagudo-Mera *et al.*, 2012 ; Musikasang *et al.*, 2009 ; Taranto *et al.*, 2006 ; Shah, 2000). De nombreuses études ont révélé que les bactéries probiotiques peuvent ne pas survivre en nombre suffisant lorsqu'elles traversent le tractus gastro-intestinal lors de tests *in vitro*, c'est le cas de l'étude de Fontana *et al.*, (2013), Sanz, (2007) et Takahashi *et al.*, (2004) qui ont remarqué que les Bifidobactéries extrêmement sensibles aux pHs bas, affichant des taux de survie faibles ou inexistantes aux pH 2 et pH 3, si comparé avec les Lactobacilles qui ont été plus résistants. Aussi le cas pour les études de Argyri *et al.*, (2013), de Kimoto *et al.*, (2004) et de Kumagai *et al.*, (2001) ayant montré que les bactéries lactiques, à l'origine de biotope animal, sont proportionnellement très sensibles aux environnements acides et ne possèdent donc pas une capacité d'adhésion aux cellules intestinales par rapport à celles d'origine végétale (Oh & Jung, 2015). Cependant, un pH allant de 2 à 5 et des concentrations de sels biliaires de 0.3 à 2 % sont considérés comme critiques pour la sélection des microorganismes probiotiques (Ogunremi *et al.*, 2015 ; Psani & Kotzekidou, 2006). Même si le nombre de bactéries est maintenu pendant la durée de conservation du produit, la viabilité peut être compromise par les stress gastro-intestinaux (Ashraf *et al.*, 2016 ; Salminen *et al.*, 1998). Par percolation, la technique d'encapsulation par piégeage dans des billes d'alginate de calcium pour immobiliser les bactéries probiotiques est une approche qui suscite actuellement un

intérêt significatif (Musikasang *et al.*, 2009 ; Chandramouli *et al.*, 2004 ; Kailasapathy, 2002). Hors, il est important que les souches ingérées atteignent le côlon en quantités suffisamment importantes pour faciliter la colonisation et conférer des effets bénéfiques à l'hôte (Weber & Polanco, 2012). Par ailleurs, plusieurs tests sont couramment utilisés *in vitro* pour vérifier la survie et la persistance intestinales d'une souche probiotique potentielle en l'exposant à des facteurs de stress gastro-intestinaux simulés (pHs bas, enzymes digestives, sels biliaires) (Vera-Pingitore *et al.*, 2016 ; Papadimitriou *et al.*, 2015 ; Tuomola, *et al.*, 2001).

La capacité à adhérer à la muqueuse intestinale est l'un des critères de sélection les plus importants pour les probiotiques, car l'adhésion à la muqueuse intestinale est considérée comme une condition préalable à la colonisation (Tuomola *et al.*, 2001). Cette propriété fonctionnelle compétitive conduit à l'exclusion des agents pathogènes et/ou à la modulation des réponses des cellules hôtes (Harzallah & Belhadj, 2013 ; Montegudo-Mera *et al.*, 2012 ; Musikasang *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2007 ; Tuomola *et al.*, 2001). L'adhésion aux cellules épithéliales est liée à la fois à la capacité d'auto-agrégation des cellules probiotiques assurant une densité élevée et aux propriétés hydrophobes de la surface cellulaire assurant une bonne interaction entre les cellules probiotiques et les cellules épithéliales. L'auto-agrégation peut être évaluée par mesure à différents intervalles de temps de l'absorbance de la suspension probiotique pure dans une solution PBS (Ogunremi *et al.*, 2015 ; Tuo *et al.*, 2013 ; Kos *et al.*, 2003). L'hydrophobicité de la surface cellulaire peut être mesurée par MATH (*Microbial adhesion to hydrocarbons*) (Chelliah *et al.*, 2016 ; Duary *et al.*, 2011). La technique la plus simple consiste à suspendre la souche probiotique dans un mélange de l'eau distillée avec un hydrocarbure. L'hydrophobicité de la souche est mesurée par absorbance à 600 nm, les cellules peuvent être facilement observées au microscope à agrandissement $\times 100$ (Rosenberg, 2006). La capacité d'adhésion directe aux cellules épithéliales de mammifères, telles que Caco-2, HT-29, fœtal I-407, est une autre façon d'évaluer *in vitro* la propriété de l'adhésion microbienne (Leite *et al.*, 2015 ; Fontana *et al.*, 2013 ; Ramos *et al.*, 2013). Bien que ces tests soient importants pour une sélection préliminaire, des essais *in vivo* sont nécessaires afin de fournir une déclaration crédible sur la survie et la persistance (Vera-Pingitore *et al.*, 2016 ; Oozer *et al.*, 2006).

En termes de propriétés fonctionnelles, les microorganismes probiotiques et en particulier les bactéries lactiques ont des composants cellulaires et peuvent aussi produire et libérer dans les aliments des composés tels que les EPS, les vitamines, les enzymes, les peptides et les lipides bioactifs notamment (de Souza *et al.*, 2017 ; Amalaradjou *et al.*, 2012; Galvez *et al.*, 2010). Les EPS, les vitamines (B2, B9 et B12) ont des effets anti-gastrite, anti-ulcéreux, hypocholestérolémiant et anti-tumoraux (cancer colorectal et du sein), et des effets atténuant l'anémie, la maladie d'Alzheimer, ainsi que l'ostéoporose. Les lipides bioactifs, quant à eux ont des effets cardiovasculaires, digestifs, endocriniens, immunitaires et neurologiques, également anti cancérigènes, anti oxydants et hypocholestérolémiants. Les enzymes (BSH, β -galactosidase, phytase, feruloyl estérases) ont des effets hypolipimians, anti-cancéreux, anti-stress oxydatif et affections liées au maladies neurodégénératives, anti diabète, aussi sont utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires, l'intolérance au lactose et les effets du vieillissement (de Souza *et al.*, 2017 ; Mukdsi *et al.*, 2013 ; LeBlanc *et al.*, 2011 ; De Angelis *et al.*, 2003).

L'activité acidifiante et la production de diacétyl, d'EPS, d'éthanol et d'enzymes sont des propriétés technologiques souhaitables (de Souza *et al.*, 2017). Ces propriétés ont été attribuées à différentes espèces lactiques. Pour l'aptitude acidifiante : les souches de *Lc. lactis subsp. Lactis ssp. cremoris* et biovar *Diacetylactis* (Lafarge *et al.*, 2004 ; Casalta *et al.*, 1995). Pour les EPS, composés considérés comme des agents épaississants : les souches de *Lb. Delbrueckii ssp. bulgaricus* et *St. thermophilus* (Durlu-Özkaya *et al.*, 2007 ; Amatayakul *et al.*, 2006), et les souches de *Lc. lactis ssp. cremoris* (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005). Également les substances néoformées par protéolyse et lipolyse telles que les acides aminés aromatiques, les aldéhydes, les acides, les alcools, les composés soufrés sont reconnus pour leurs propriétés technologiques (Andiç *et al.*, 2015 ; Martinez-Cuesta *et al.*, 2001). L'activité protéolytique hydrolyse les protéines en peptides de 7 à 16 résidus aminés qui seront dégradés par des exopeptidases ou endopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides (Roudj *et al.*, 2009 ; Monnet *et al.*, 2008 ; Donkor *et al.*, 2007). Les acides gras libres et les esters augmentent la sécurité des produits et fournissent une texture et une saveur améliorées aux produits (Holland *et al.*, 2005). Les Lactobacilles (*Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*) produisent de l'acétaldéhyde. Les Leuconostocs

hétérofermentaires sont associés souvent aux Lactocoques dans la production de composés aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyl et acétoïne) (Mahaut *et al.*, 2000).

De récentes découvertes ont établi le lien entre les microorganismes probiotiques et la prévention des maladies cardiovasculaires en abaissant le taux sérique du cholestérol (Ooi & Liang, 2010). Les probiotiques agissent pour diminuer la solubilité du cholestérol et par conséquent réduisent son absorption intestinale (de Melo Pereira *et al.*, 2018). En sus, les microorganismes probiotiques peuvent empêcher la prise de poids corporel et la résistance à l'insuline par modulation de la composition de la flore intestinale et stimulation de la formation d'hormones intestinales, telles que le peptide-1 de type glucagon et le polypeptide inhibiteur gastrique (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Kerry *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2016).

Pour l'évaluation de la sécurité des microorganismes probiotiques, la FAO/OMS, (2002) a formulé des lignes directrices recommandant l'évaluation de l'innocuité par certain nombre de paramètres, y compris le profil de sensibilité aux antibiotiques, les activités métaboliques (production de D-lactate, déconjugaison des sels biliaires), les activités hémolytiques, l'évaluation des effets secondaires au cours d'études sur l'homme, la surveillance épidémiologique des incidents indésirables chez les consommateurs (après la mise sur le marché) (FAO/OMS, 2002 ; Reid, 2005). D'autres recommandations courantes incluent l'origine d'isolement, l'identification taxinomique, l'absence de facteurs de virulence (activités gélatinase, hémolysine ou ADNase), d'infectiosité, de toxicité, ajoutant une mesure de confiance dans l'innocuité et qui sont de même formulées par la communauté Européenne (*The European Union Novel Food Regulation*), par les États-Unis (FDA et OMS) et par le Canada (*NHPR : Natural Health Products Regulations*) (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Le profil de sensibilité aux antibiotiques (sensibilité et tolérance) est un paramètre aussi carrefour de sélection des probiotiques (Ashraf *et al.*, 2016 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012 ; Ruiz *et al.*, 2011 ; Vasiljevic & Shah, 2008). Plusieurs microorganismes probiotiques produisent de BSH et aident à réduire le cholestérol et par conséquent, l'activité de BSH est également considérée comme un critère supplémentaire fonctionnel pour la sélection des probiotiques (Miremadi *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces caractéristiques requises est plus au moins mesurable, et les nouveaux candidats probiotiques (souches et/ou produits) peuvent être évalués en six étapes successives :

- (1) Identification phénotypique et génotypique de la souche probiotique pour déterminer sa classification taxinomique, ce qui peut donner une indication de son origine, de son habitat et de sa physiologie, ceci avec dépôt dans une collection de cultures internationales pour que les consommateurs sachent exactement les souches contenues dans les produits. L'identification au niveau du genre et de l'espèce pourrait être assurée en utilisant des techniques universellement acceptées, telles que l'hybridation ADN-ADN, le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S, la PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), la RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). D'autres sont en cours de développement, telles que la T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment-Length Polymorphism*) et l'ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*) et la REP-PCR (*repetitive extragenic palindromic PCR*) ;
- (2) Caractérisation fonctionnelle *in vitro* et/ou sur model animal ;
- (3) Evaluation de critères sécuritaires par des études *in vitro* et/ou sur model animal, phase I : étude sur model humain ;
- (4) Evaluation de l'efficacité, phase II : étude sur model humain avec des ECR, double aveugle et contrôle placebo. L'avantage de cette phase est la comparaison directe avec le groupe placebo, et les résultats doivent être clairs et mesurables ;
- (5) Etude d'effectivité, phase III : étude sur model humain et comparaison de l'intervention probiotique avec le traitement standard, l'avantage de cette phase est de déterminer l'efficacité de l'intervention par rapport au traitement standard pour une affection bien particulière ;
- (6) Allégation santé et labélisation (**Figure 4.4**) (**Harzallah & Belhadj, 2013 ; Morelli, 2007 ; Reid, 2005 ; FAO/OMS, 2002**).

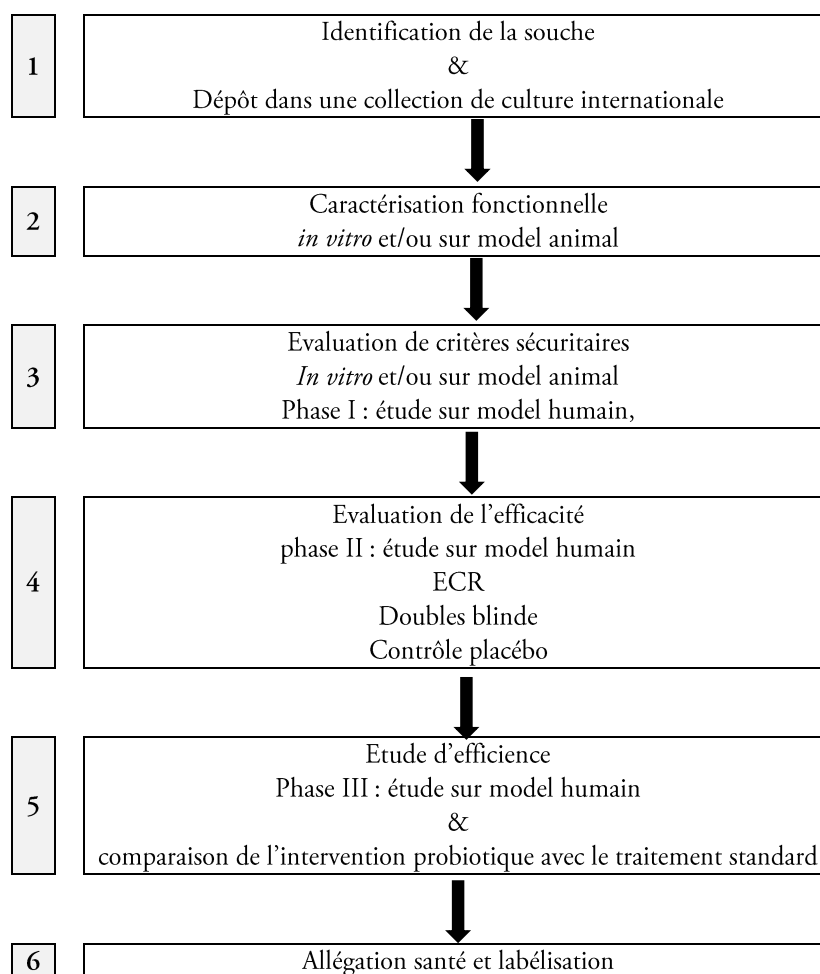


Figure 4.4 : Schéma des lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques à usage alimentaire (FAO/OMS, 2002)

Après les essais *in vitro* et sur des modèles animaux, les ECR contrôle placebo sont l'étalon-or pour évaluer les probiotiques (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Ces essais doivent être établis avec la détermination de la population cible de l'étude, sa taille et le groupe témoin. L'intervention probiotique peut être menée en mono dose ou en multi doses, ces dernières étant préférées pour évaluer la dépendance à la dose et la relation dose-réponse (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Gou *et al.*, 2014).

En guise de conclusion, la quête d'un probiotique avec des propriétés panacée est rarement voire nullement satisfaite, mais le screening d'un probiotique remplissant le minimum des bienfaits appropriés est le fruit d'une longue haleine de criblage scrupuleux et de nombreuses épreuves auxquelles est soumise une liste plus ou moins importante de souches venant souvent de divers biotopes (Ashraf *et al.*, 2016 ; FAO/OMS, 2002 ; Dunne *et al.*, 2001). Pour la sélection de nouveaux candidats probiotiques, une approche systématique de criblage et évaluation comprenant une séquence de critères protectifs, fonctionnels et technologiques est actuellement utilisés selon les lignes directrices de la FAO/OMS, (2002) et autres études (Figure 4.5) (de Melo Pereira *et al.*, 2018).

Le but de cette dernière partie du travail était d'étudier certaines propriétés probiotiques. Trente (30) isolats lactiques autochtones provenant de *Guedid* ont été soumis à un criblage *in vitro* pour évaluer leur potentiel probiotique.

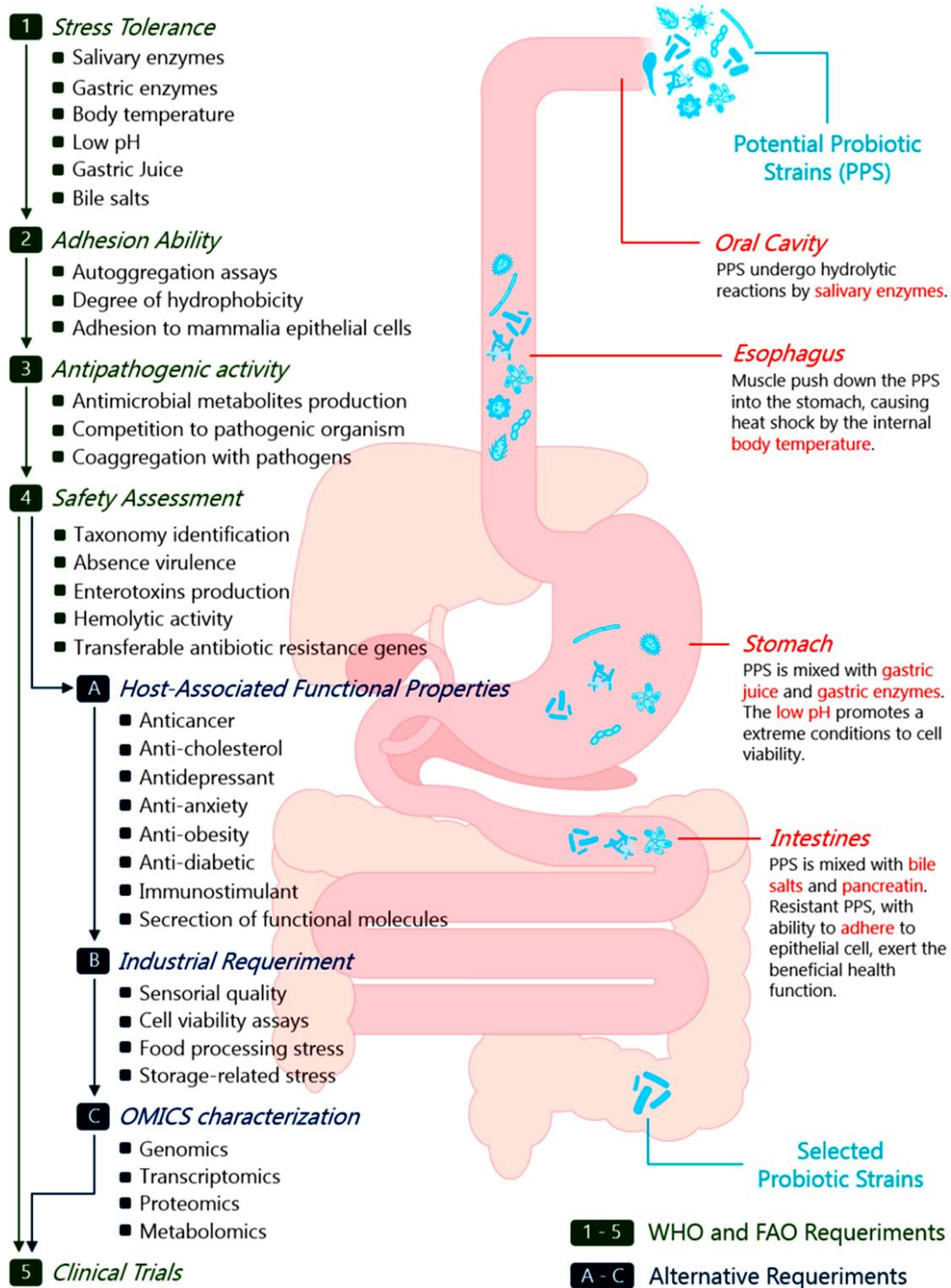


Figure 4.5 : Approche systématique de criblage et évaluation protectifs, fonctionnels et technologiques requis selon les lignes directrices de la FAO/OMS, (2002) et autres études (de Melo Pereira *et al.*, 2018)

4.3 Matériel et méthodes

4.3.1 Matériel de paillasse et produits de laboratoire

a. Matériel de paillasse

- Distillateur *Schott*[®] ;
- Incubateur bactériologique *Memmert*[®] *IN 110* ; incubateur bactériologique réfrigéré *Memmert*[®] *IPP 110* ; étuve *Memmert universelle*[®] *UF 110* ;
- Bain marie *Memmert*[®] *WNB 22* ;
- Compteur de colonies *Schütt*[®] ;
- Spectrophotomètre *Optizen*[®] *1412 V+* cuvettes en quartz ;
- Centrifugeur de paillasse *Sigma*[®] *2-16 KL* + tubes de centrifugation ;
- Vortex *Heidolphreax control*[®] ; agitateur secoueur *GFL*[®] *3006* ; agitateur plaque chauffante *Ikamag*[®] ;
- pH mètre *Ohaus*[®] *Starter 3100* ;
- Autoclave *Advantage-lab AL 02-10* ;
- Balance analytique *Sartorius*[®] *E 5500 S* ; balance de précision *Mettler*[®] *AE160* et *Ohaus*[®] ;
- Dessiccateur en verre ambré ;
- Bec *Mecker*[®] ;
- Réfrigérateur et congélateur *Eniem*[®] ;
- Minuterie avec affichage de température ;
- Software (Microsoft Office Excel 2016; *OriginLab Pro* v9.5).

b. Produits de laboratoire

- Anse de platine ; ciseaux ; pince ; spatule ;
- Boîtes de Pétri stériles à usage unique ;
- Pipettes Pasteur ; tubes à essai ; micro tubes eppendorf ;
- Coton cardé ; gants en latex ;
- Pipettes *pumpIoslab* ;
- Micropipettes réglables 10-100 µL et 100-1000 µL ;
- Embouts bleus 1000 µL et embouts jaunes 200 µL ;
- Ethanol à 95° ; chloroforme ; solution iodée iodurée (lugol), sulfate d'ammonium saturé ;
- Papier : parafilm ; collant ; filtre et hygiénique ;
- Portoirs métalliques ; erlenmeyer à vis 250 mL ; verrerie sèche et propre ;
- Règle millimétrique ; appareil photo numérique ; marqueur noir ;
- Peptone de caséine ; extrait de levure ; extrait de viande ;
- Phosphate di potassique (K₂HPO₄) ; phosphate mono potassique (KH₂PO₄) ; chlorure de sodium (NaCl) ; acide chlorhydrique (HCL 1N) ;
- Solution étalon de sulfate de Barium BaSO₄ (0.5 McFarland) ;

- Réactifs de révélation : VPI et VPII ;
- MRS (*De Man.*, *Rogosa & Sharpe*, *Pronadisa*[™]) ;
- TSB (*Trypticase Soy Broth*, *Pronadisa*[™]) ; gélose trypticase de soja (TSA, *Pronadisa*[™]) ;
- Gélose MH (*Muller Hinton*, *Pronadisa*[™]) au sang ;
- TSE (*Tryptone Sel Eau*) ;
- Agar ; sels biliaires ; lait écrémé ; tween 80 ; amidon ; cholestérol ; saccharose ; gélatine ; xylène et le toluène ;
- Enzymes protéolytiques : pepsine ; α -chymotrypsine
- Disques antibiotiques : *Penicillin* (10 μ g), *Ampicillin* (10 μ g), *Amoxicillin* (30 μ g), *Ceftiofur* (30 μ g), *Oxytetracyclin* (30 μ g), *Tylosin* (10 μ g), *Sulfadiazin* (10 μ g), *Florfenicol* (10 μ g), *Vancomycin* (30 μ g), *Erythromycin* (15 μ g), and *Gentamicin* (1 μ g).

4.3.2 Matériel bactérien

Les souches les plus sensibles lors du screening primaire ; *B. cereus* ATCC 11778, *En. faecalis* ATCC 29212, *L. ivanovii* ATCC 19119, *Cl. perfringens* CECT 486 et *St. aureus* ATCC 25923 (**Tableau 3.1**) ont été revivifiées à 37 °C pendant 24 h dans le bouillon trypticase de soja (TSB, *Pronadisa*[™]), puis sur gélose de trypticase de soja (TSA, *Pronadisa*[™]), ensuite conservées à 4 °C sur la même gélose en tubes inclinés. Dix (10) isolats de bactéries lactiques parmi les trente (30) les plus redoutables à l'issue de la partie précédente, à savoir : *Aerococcus spp.* (Lbm3, 10, 17, 18 et 19), *Enterococcus spp.* (Lbm46, 47, 49 et 50) et *Weisella sp.* Lbm22 ont été quant à eux réactivées à 30 °C pendant 24-72 h sous incubation anaérobique par transfère sur gélose *De Man.*, *Rogosa & Sharpe* (MRS, *Pronadisa*[™]), ensuite conservés à 4 °C sur la même gélose en tubes inclinés (De Valdez, 2001). Le matériel bactérien a été régulièrement vérifié en effectuant la coloration de gram et la recherche de l'enzyme catalase, selon les protocoles standards (Chaskes, 2009).

4.3.3 Suivi de croissance et activité antimicrobienne

a. Suivi cinétique de croissance et d'acidité

Pour suivre la croissance des isolats ainsi que la mesure de l'acidité, des cultures jeunes de 18 h standardisées (DO de 0.1 à 620 nm ; 10⁸ UFC/mL) ont étéensemencées dans un bouillon MRS à raison de 2 % dans des erlenmeyers bouchonnés avec le coton cardé, puis incubées à 30 °C

avec agitation 100 tr/min dans le but d'une meilleure homogénéisation. Après 2, 6, 12, 18, 24, et 48 heures d'incubation, des mesures de pH et de densité optique ont été réalisées au moyen de pH-mètre et du spectrophotomètre à la longueur d'onde de 620 nm, respectivement. L'expérience a été répétée trois fois (Musikasang *et al.*, 2012 ; Musikasang *et al.*, 2009).

b. Suivi de production de l'agent inhibiteur

Les surnageants retenus après centrifugation à 6000 tr/min (soit 3824 x g) pendant 15 min à 4 °C ont été évalués aux intervalles de temps ; 2, 6, 12, 18, 24, et 48 h à l'encontre des souches pathogènes cibles. Pour ce faire, 20 mL de gélose TSA molle (0.75 % w/v d'agar) tamponnée (pH 7.4/0.1 M : 19.5 parts de K₂HPO₄ à 0.2 M avec 30.5 parts de KH₂PO₄ à 0.2 M dans un total de 100 parts d'eau distillée) (réactifs, *Sigma-Aldrich*) (Kuhlmann, 2006) ont été coulés dans des boîtes de pétri et ensemencés en surface avec 200 µL de culture cible à charge ajustée (DO 0.1 à 620 nm ; 10⁸ UFC/mL). Par la suite, onze (11) puits confectionnés à l'aide de pipette Pasteur, équidistants de 2 cm environ, de diamètre 7 mm pour recevoir chacun 40 µL de surnageant des cinq (5) isolats par boîte testés en double (deux essais simultanés), le onzième puits étant rempli du même volume de bouillon MRS pour servir de témoin. Les boîtes ont été entreposées à 20 °C pendant 2 h pour la prédiffusion des surnageants avant d'être incubées à 30 °C pendant 24 h en anaérobiose. La vérification des zones d'inhibition s'est faite sur un compteur de colonies muni d'un système d'éclairage. La constatation d'une zone d'inhibition à la périphérie des puits suggère une activité antibactérienne bactériocénogénique. Les diamètres ont été mesurés à l'aide d'une règle millimétrique. Était considérée comme positive toute zone de 0.5 mm de diamètre ou plus (Leite *et al.*, 2015 ; Hanchi *et al.*, 2014 ; Benreguieg *et al.*, 2013 ; Musikasang *et al.*, 2012 ; Musikasang *et al.*, 2009).

c. Sensibilités, lysogénie et quantification des bactériocines

La sensibilité à différentes températures (100 °C durant 10, 30, 60 min et 120 °C durant 15 min) et à l'action des enzymes protéolytiques (pepsine et α-chymotrypsine) (réactifs, *Sigma-Aldrich*), a été testée au moyen de la technique de diffusion en puits sur gélose contre les souches pathogènes cibles (en double ; deux essais simultanés). Les surnageants ont été récoltés après

centrifugation à 6000 tr/min pendant 15 min à 4 °C et répartis en fractions comme suit : (1) contrôle positif ; (2 et 3) traitées par les enzymes protéolytiques à la dose de 1 mg.mL⁻¹ (la pepsine dissolue dans un tampon pH 3 et l' α -chymotrypsine dans un tampon phosphate pH 7.5) ; (4, 5, 6 et 7) soumises aux traitements thermiques. Les fractions traitées par les enzymes ont été incubées à 25 °C pendant 2 heures au terme desquelles un chauffage à 100 °C pendant 5 min vient inhiber l'activité des enzymes. Après incubation à 30 °C pendant 24 h, les zones d'inhibition ont été vérifiées en utilisant le fond clair du compteur de colonies (Hanchi *et al.*, 2014 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2011).

En ce qui concerne l'élimination d'une possible activité due aux phages lysogènes, une portion de gélose correspondante à la zone d'inhibition a été découpée puis introduite dans 1 mL de solution tampon phosphate saline contenant 50 μ L de chloroforme et agitée pendant 5 min. Ensuite, 300 μ L ont été inoculés dans une gélose molleensemencée avec 100 μ L de la souche cible. Après 24 h d'incubation à 37 °C, la présence de plages de lyse (trous dans la gélose) indique une inhibition due à la présence de phages. L'expérience fut répétée deux fois.

Quant à la quantification des bactériocines, les surnageants bruts obtenus comme décrit ci-dessus ont été sujets à la détermination de leurs concentrations calculées et exprimées en unité arbitraire par millilitre (UA/mL). Une série de dilutions critiques (dilutions géométriques *two folds*) de ; 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 et 1 : 64 des surnageants préparée dans l'eau distillée stérile. Le test d'activité antibactérienne a été effectué selon le protocole décrit ci-avant. L'expérience a été répétée deux fois. L'inverse de la plus grande dilution inhibitrice multiplié par cent représente l'activité antimicrobienne en UA/mL (Leite *et al.*, 2015 ; Delgado *et al.*, 2005 ; Cuzzo *et al.*, 2001).

d. Analyse des résultats

A l'issue de ces tests, les moyennes des diamètres d'inhibition des isolats de bactéries lactiques ont été calculées (\pm les écarts types) pour toutes les expériences, ensuite comparées et classées selon les diamètres et les scores d'inhibition contre les quatre souches cibles. Ceci a été réalisé au moyen de calcul sur feuille Excel 2016 (Johnson, 2014).

4.3.4 Caractérisation des propriétés technologiques

a. Thermorésistance

La Thermorésistance des isolats lactiques a été déterminée par chauffage à 60 °C pendant 30 min suivi d'un essai de culture. Au terme de 48 h d'incubation à 30 °C, les boîtes ont été examinées et une résistance positive est notée par la croissance de l'isolat correspondant. L'expérience fut répétée deux fois (Samelis, 1994).

b. Pouvoirs lipolytique, protéolytique et amylolytique

L'habilité de digestion des lipides, des protéines et de l'amidon a été déterminée sur gélose MRS additionnée à 1 %, 2 % et à 10 % du lait écrémé, à 1 % et à 3 % du tween 80 (polysorbate) et sur gélose MRS modifiée (sans dextrose) additionnée à 2 % d'amidon (réactifs, *Sigma-Aldrich*). Après solidification des géloses sur boîtes de Pétri, les isolats de bactéries lactiques ont étéensemencés par touches au moyen de l'anse à partir des cultures jeunes de 18 h ou par stries à raison de cinq isolats par boîte. Au terme d'incubation à 30 °C pendant 24 à 48 h, les diamètres des halos autour des colonies (halos transparents autour des spots) sur gélose MRS au lait écrémé et tween 80 ont été mesurés directement, alors que sur gélose MRS à l'amidon ont été mesurés 15 à 30 min après révélation par inondation à la solution iodée iodurée à 1 %. Une activité de digestion a été jugée positive quand le diamètre dépasse 1 mm. L'expérience a été répétée deux fois (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2016 ; Musikasang *et al.*, 2012 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2011 ; Musikasang *et al.*, 2009).

c. Production des EPS et d'acétoïne

La capacité de production des EPS a été testée sur gélose MSE hypersaccharosée (10 % w/v) de saccharose (*Sigma-Aldrich*). Après solidification de gélose sur boîte de Pétri, les isolats de bactéries lactiques ont étéensemencés en stries et chaque boîte avec cinq secteurs a reçu cinq cultures. Au terme d'incubation à 30 °C pendant 24 à 48 h, la production des EPS se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes. L'expérience fut répétée deux fois (Angmo *et al.*, 2015 ; Leveau *et al.*, 1991).

Pour tester la capacité de réaliser la fermentation d'acétylméthylcarbinol et production d'acétoïne, les isolats de bactéries lactiques ont été ensemencés sur milieu Clark et Lubs. Après incubation à 30 °C pendant 24 h, la vérification a été faite par ajout de 0.5 mL des deux réactifs de VPI et VPII à chaque tube. Après 10 min, l'apparition d'un anneau et/ou la diffusion de la couleur rose à la surface du milieu traduit la fermentation et l'acétoïne formée avec l'action combinée des deux réactifs donnant un complexe rose-rouge. L'expérience a été répétée trois fois (Leveau *et al.*, 1991).

4.3.5 Caractérisation des propriétés fonctionnelles

a. Tolérance à l'acidité

La tolérance à l'acidité a été déterminée en ensemencant les suspensions (cultures de 24 h/30 °C) standardisées (DO 0.1 à 620 nm ; 10^8 UFC/ml) dans une solution PBS (0.9 % NaCl, 0.9 % K_2HPO_4 , 0.15 % KH_2PO_4) (réactifs, *Sigma-Aldrich*) ajustée à pH 2 et 3. Au terme d'incubation à 37 °C, un dénombrement des cellules viables a été réalisé aux temps 0 et 4 h sur la surface de gélose MRS (*SP-SDS : Single plate - serial dilution spotting*) incubée à 37 °C pendant 48 h. Des microdilutions décimales jusqu'à 10^7 ont été préparées (0.1 μ L de suspension + 0.9 μ L de TSE). Le nombre des cellules viables a été calculé en retenant les secteurs dont le nombre de colonies est compris entre 3 et 60 ($n \times 5 \times 10^{d+1}$). Le pourcentage des bactéries viables a été calculé comme suit : taux de survie = (bactéries survivantes (UFC/mL)/bactéries initiales (UFC/mL)) x 100. L'expérience a été répétée deux fois (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2016 ; Serrano-Niño *et al.*, 2016 ; Thomas *et al.*, 2015 ; Tokatlı *et al.*, 2015 ; Oh & Jung, 2015).

b. Tolérance aux conditions gastriques et intestinales simulées

La tolérance aux conditions gastriques a été testée dans un bouillon simulant les conditions gastriques, ceci par la suspension de 3 mg/mL de pepsine (*Sigma-Aldrich*) dans de l'eau physiologique à 8.5 % d'NaCl ajustée au pH 3. Les cultures de 24 h des isolats lactiques ont été standardisées (DO 0.1 à 620 nm ; 10^8 UFC/mL) et suspendues dans le bouillon gastrique et incubées à 37 °C. La tolérance a été évaluée par comptage de colonies (bactéries viables) au début du test (0 h) et au terme de quatre heures (4 h) de la même manière que pour le test précédent. Le

pourcentage des bactéries viables a été calculé comme suit : $\text{taux de survie} = (\text{bactéries survivantes} / \text{bactéries initiales (UFC/mL)}) \times 100$. L'expérience a été répétée deux fois (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2016 ; Serrano-Niño *et al.*, 2016 ; Thomas *et al.*, 2015 ; Tokatlı *et al.*, 2015 ; Oh & Jung, 2015).

Pour la tolérance aux conditions intestinales, celle-ci a été déterminée dans une suspension saline supplémentée de 0.3 % de sels biliaires (*Sigma-Aldrich*) ajustée au pH 8 et inoculé avec des cultures de 24 h/30 °C standardisées (DO 0.1 à 620 nm ; 10^8 UFC/mL). L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 4 h, ensuite la viabilité des cellules lactiques a été déterminée aux temps 0 et 4 h selon la technique de gouttes (*SP-SDS*). Le pourcentage des bactéries viables a été calculé comme suit : $\text{taux de survie} = (\text{bactéries survivantes} / \text{bactéries initiales (UFC/mL)}) \times 100$. L'expérience a été répétée deux fois (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2016 ; Serrano-Niño *et al.*, 2016 ; Thomas *et al.*, 2015 ; Tokatlı *et al.*, 2015 ; Oh & Jung, 2015).

c. Réduction du cholestérol

La réduction du cholestérol a été déterminée dans un bouillon MRS additionné de 50 µg/mL de cholestérol hydrosoluble (*Quimica clinica*), les isolats lactiques ont été inoculés à 1 % à partir des cultures jeunes de 24 h/30 °C (charge d'environ 10^8 UFC/mL). Au terme d'incubation de 24 h/37 °C, les cultures ont subi une centrifugation à 6000 tr/min pendant 15 min à 4 °C. Les surnageants obtenus ont été dosés selon le protocole *Quimica Clinica* pour déterminer les taux de cholestérol assimilé au cours de la croissance. L'expérience a été réalisée avec un témoin négatif (MRS non inoculé additionné au cholestérol). Le calcul a été fait de la manière suivante : $\text{DO essai} \times 200 / \text{DO étalon} = \text{mg de cholestérol par dL}$. La différence de teneur en cholestérol entre le tube témoin et les tubes test a été considérée comme taux du cholestérol assimilé. L'expérience a été répétée deux fois (Tokatlı *et al.*, 2015 ; Dubey & Jeevaratnam, 2015).

d. Auto-agrégation, co-agrégation et hydrophobicité

Le pouvoir d'auto-agrégation des isolats lactiques a été mesuré de la manière suivante : les cultures jeunes (30 °C/24 h MRS) ont été centrifugées à 6000 tr/min pendant 10 min à 4 °C, puis

inoculées dans une solution PBS (0.9 % NaCl, 0.9 % K₂HPO₄, 0.15 % KH₂PO₄, pH 7) afin d'obtenir une DO équivalente à 0.25 à 620 nm. Les préparations ont été incubées à 37 °C. L'absorbance des surnageants (centrifugation à 1681 tr/min (soit 300 x g) pendant 2 min à 20 °C) a été mesurée à 600 nm après 0, 1 et 3 heures d'incubation. Le pourcentage d'auto-agrégation a été déterminé selon la formule : $A \% = (A_0 - A)/A_0 \times 100$; où A₀ et A sont les mesures de l'absorbance au début et à la fin de l'expérimentation. L'expérience a été répétée deux fois (Serrano-Niño *et al.*, 2016 ; Ng *et al.*, 2015 ; Angmo *et al.*, 2015 ; Todorov *et al.*, 2011).

Le pouvoir de co-agrégation avec les souches cibles a été déterminé comme suit : les cultures jeunes des isolats lactiques (30 °C/24 h MRS) et des souches cibles (37 °C/24 h TSB) ont été centrifugées à 6000 tr/min pendant 10 min à 4 °C, puis suspendues dans une solution PBS (0.9 % NaCl, 0.9 % K₂HPO₄, 0.15 % KH₂PO₄, pH 7) de façon à obtenir une DO de 1.0 à 620 nm. Un (1) mL de chaque préparation (isolats tests et souches cibles) a été mélangé dans des microtubes. L'incubation a été faite à 30 °C. La DO a été mesurée au début et après incubation (3 h) sur les surnageants (centrifugation à 300 x g pendant 2 min à 20 °C). Le pourcentage de co-agrégation a été déterminé selon la formule : $C \% = (C_0 - C)/C_0 \times 100$; où C₀ et C sont les mesures de l'absorbance au début et à la fin de l'expérimentation. L'expérience a été répétée deux fois (Dubey & Jeevaratnam, 2015 ; Todorov *et al.*, 2011).

Le pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de la muqueuse intestinale a été évalué *in vitro* par mesure de la capacité de l'adhésion aux surfaces hydrophobes (toluène). Les cultures jeunes des isolats lactiques (30 °C/24 h MRS) ont été centrifugées à 6000 tr/min pendant 15 min à 4 °C, puis inoculées dans une solution PBS (0.9 % NaCl, 0.9 % K₂HPO₄, 0.15 % KH₂PO₄, pH 7) afin d'obtenir une DO à 1.0 à 620 nm, par la suite, 3 mL de chacune des préparations ont été mélangés avec 600 µL de toluène, agitée pendant 2 min (par vortex). Après incubation à 37 °C pendant 1 h, la mesure de l'absorbance de la phase aqueuse a été effectuée à 600 nm et le pourcentage d'adhésion a été calculé selon la formule : $H \% = (A_0 - A)/A_0 \times 100$; où A₀ et A sont les mesures de l'absorbance avant et après extraction avec le toluène. L'expérience a été répétée deux fois (Serrano-Niño *et al.*, 2016 ; Tokatlı *et al.*, 2015 ; Vinderola & Reinheimer, 2003).

4.3.6 Caractérisation des propriétés sécuritaires

a. Hémolyse et gélatinase

Une probable activité hémolytique des dix (10) isolats lactiques a été cherchée sur gélose MH (*Muller Hinton, Pronadisa™*) additionnée de 5 % de sang humain frais. Après la solidification de gélose sur boîte de Pétri, les isolats lactiques ont été ensemencés par stries à partir des cultures jeunes de 18 h à raison de cinq isolats par boîte. Au terme d'incubation à 30 °C pendant 24 à 48 h, l'aspect de la gélose autour des colonies a été examiné. Une activité hémolytique positive se traduit par des zones de lyse autour des stries. Les isolats donnant des zones de couleur verte (α -hémolyse) ou sans teinte (γ -hémolyse) ont été considérés comme non hémolytiques tandis que ceux présentant des zones de couleur jaune (β -hémolyse) ont été considérés comme hémolytiques. L'expérience a été répétée trois fois (*Angmo et al., 2015 ; Leite et al., 2015 ; Oh & Jung, 2015 ; Rather et al., 2015 ; Monteagudo-Mera et al., 2011*).

En ce qui concerne l'activité gélatinase, celle-ci a été investiguée sur gélose MRS contenant 3 % de gélatine. Les isolats lactiques ont été ensemencés par touches à partir des cultures de 18 h. L'incubation a été faite à 30 °C pendant 24 à 48 h et les diamètres des éventuels halos autour des spots ont été mesurés après révélation par inondation par une solution saturée de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*Sigma-Aldrich*). L'expérience a été répétée trois fois (*Monteagudo-Mera et al., 2011*).

b. Hydrolase des sels biliaires (BSH)

L'hydrolyse des sels biliaires a été déterminée par ensemencement en stries sur gélose MRS contenant 0.5 % de sels biliaires et 0.037 % de CaCl_2 (réactifs, *Sigma-Aldrich*). Chaque boîte avec cinq secteurs a reçu cinq cultures. L'incubation a été faite à 30 °C pendant 24 h (48, voire 72 h). L'activité de l'enzyme responsable de l'hydrolyse se manifeste par l'apparition de zones de précipitation autour des stries. L'expérience a été répétée deux fois (*Ruiz Rodríguez et al., 2016 ; Musikasang et al., 2012 ; Monteagudo-Mera et al., 2011 ; Musikasang et al., 2009*).

c. Susceptibilité aux antibiotiques

La détermination de sensibilité et/ou de résistance a été pratiquée selon la technique de la diffusion *Kirby-Bauer* modifiée, technique normalisée et recommandée par l'OMS. Tout d'abord, la gélose MRS a été coulée de façon à obtenir une surface plane et une profondeur d'environ 4 mm. Une fois solidifiée et séchée (20 minutes à 20 °C à l'étuve), cette gélose a étéensemencée en étalant 100 µL de la suspension bactérienne (DO 0.5 McFarland, 10⁸ UFC/mL). Ensuite, les boîtes ont été laissées sécher pendant 3 à 5 min à température ambiante afin de déposer à l'aide d'une pince stérile les disques d'antibiotiques (*Oxoid, Australia*). Les boîtes ont subi une pré-incubation à 20 °C à l'étuve pendant 20 min, et l'incubation proprement dite a été faite à 30 °C pendant 24 h. Les diamètres de chaque zone (y compris le diamètre du disque) ont été notés et le résultat a été ensuite interprété en les comparant avec des diamètres critiques (**Ruiz Rodríguez *et al.*, 2016 ; Angmo *et al.*, 2015 ; Oh & Jung, 2015 ; Dubey & Jeevaratnam, 2015 ; Musikasang *et al.*, 2012**).

4.3.7 Analyse des résultats

Le traitement statistique a été réalisé au moyen de *OriginLab Pro 9.5* (taux ± écarts types) et le potentiel probiotique cumulé a été calculé comme suit : score observé/score maximum x 100 ; ou la pondération des tests a été : (0) lytique/non producteur ou (1) non lytique/producteur pour les propriétés technologiques et (0) sensibilité ou (1) résistance pour les propriétés fonctionnelles. La résistance multiple aux antibiotiques = nombre d'isolats de résistance aux antibiotiques/nombre d'antibiotiques testés x nombre d'isolats (**Halder *et al.*, 2017 ; Johnson, 2014 ; Tambekar & Bhutada, 2010**).

4.4 Résultats

4.4.1 Caractérisation de l'activité antimicrobienne

– **Suivi cinétique de croissance, d'acidité et de production de l'agent inhibiteur** : les résultats de ce test, reliant l'action inhibitrice des surnageants à la production des substances inhibitrices supposées être des bactériocines, ont montré un déclenchement de l'effet inhibiteur à partir de 16 h de vie microbienne, essentiellement, contre *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *L. ivanovii* ATCC 19119 et *Cl. perfringens* CECT 486, pour prendre une importance progressive le long de la croissance. L'activité inhibitrice de tous les isolats a gardé un rythme évolutif ; de la 16^{ème} jusqu'à la 24^{ème} heure de croissance, et le nombre des pathogènes inhibés était différemment atteint allant d'un isolat lactique à un autre. Pratiquement tous les isolats lactiques, un maximum d'activité inhibitrice à l'égard des quatre pathogènes a été constaté à 24 h mais avec un déclin juste après (à 48h). A ce pic d'activité les isolats ; *Aerococcus spp.* (Lbm3, 17, 18) et *Enterococcus sp.* Lbm50 ont exprimé une zone d'inhibition décelable de 9 mm ou plus contre trois pathogènes cibles à savoir *St. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, et *L. ivanovii* ATCC 19119. Cependant, les isolats *Aerococcus sp.* Lbm19, *Weisella sp.* Lbm22 et *Enterococcus sp.* Lbm47 ont démontré une activité détectable avec le même diamètre, ceci à l'encontre des deux pathogènes cibles *B. cereus* ATCC 11778, et *L. ivanovii* ATCC 19119. Au même moment, de ce pic, les deux isolats lactiques restants ont éprouvé soit, une activité seulement contre *B. cereus* ATCC 11778 pour *Enterococcus sp.* Lbm46, soit une non activité inhibitrice pour *Enterococcus sp.* Lbm49. En sus, au bout de 48 h de vie microbienne, *B. cereus* ATCC 11778 s'avérait le pathogène le plus sensible, suivi de *St. aureus* ATCC 25923 en deuxième position et *L. ivanovii* ATCC 19119 en troisième position. Quant au *Cl. perfringens* CECT 486, ce pathogène a affiché, seul, un effet de résistance pour la plupart des isolats lactiques testés (à ce pic de l'activité antagoniste). Pour les autres points de suivi de cette cinétique de croissance bactérienne, tous les isolats testés ont montré une expression de zone d'inhibition vis-à-vis d'au moins un pathogène, même contre *Cl. perfringens* CECT 486 (**Tableau 4.2, Figure 4.6**).

Tableau 4.2 : Résultats du suivi cinétique de production de l'agent inhibiteur

Isolats lactiques	Temps (h)						
	2h	6h	12h	18h	24h	48h	
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	-	-	-	+	+	+
	Lbm10	-	-	+	+	-	-
	Lbm17	-	-	-	-	+	-
	Lbm18	-	-	-	-	+	-
	Lbm19	-	-	-	-	-	+
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	-	-	-	-	-	-
	Lbm47	-	-	+	+	-	-
	Lbm49	-	-	-	-	-	-
	Lbm50	-	-	+	+	+	+
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	-	-	-	-	-	-

- : absence de l'activité antagoniste + : activité antagoniste de 9 mm de diamètre et plus (diamètre du puits considéré)

Les résultats de l'évolution de la DO en fonction du temps de tous les isolats lactiques ont été réunis pour une phase de latence éphémère autour de la 4^{ème} heure de croissance. Après cette phase, chaque isolat a évolué lentement pour gagner une allure d'accélération à 6 h suivie d'une croissance éclatante (exponentielle) entre 6 et 12 h, afin de décélérer entre 12 et 18 h et rester statique par la suite, ceci pour pratiquement tous les isolats lactiques testés. Différents profils d'évolution de croissance ont été remarqués et ont dressé des courbes typiques de croissance comprenant ; une phase plateau transgressée en son milieu par un pic de croissance, pour être maintenu par la suite en phase stationnaire (Tableau 4.3, Figure 4.6).

Tableau 4.3 : Résultats du suivi cinétique de croissance (DO)

Isolats lactiques	Temps (h)						
	2h	6h	12h	18h	24h	48h	
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	0.10	0.15	0.80	1.29	1.33	1.30
	Lbm10	0.10	0.15	1.02	1.07	1.10	1.09
	Lbm17	0.14	0.13	0.80	1.20	1.29	1.30
	Lbm18	0.11	0.10	1.11	1.12	1.22	1.22
	Lbm19	0.10	0.12	1.17	1.25	1.11	1.28
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	0.06	0.16	1.17	0.90	0.80	0.80
	Lbm47	0.06	0.14	0.85	0.80	0.89	0.96
	Lbm49	0.14	0.17	0.75	0.90	0.83	0.92
	Lbm50	0.05	0.5	1.08	1.21	1.30	1.28
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	0.12	0.17	0.85	1.26	1.10	1.31

Quant au pH, ses valeurs témoignent une production importante d'acides organiques par tous les isolats lactiques et durant toute la durée de culture. La régression du pH, à partir de la valeur à t_0 avoisinant les 6.60, était claire durant toutes les 48 heures, mais cependant, elle s'est caractérisée par une pente intense entre 2 et 6 h de croissance. Il faut noter que la réduction jugée au bout de la 18^{ième} heure a donné des valeurs plus ou moins basses au-dessous de la borne de 4.00, selon l'isolat. Ainsi, l'isolat *Aerococcus sp.* Lbm3 a affiché la valeur la plus basse (4.03) et *Enterococcus sp.* Lbm49 la plus haute (4.77). Ensuite, le pH continu à décliner vers les 18 h de croissance pour tomber dans le champ 3.00 en frôlant presque toujours la valeur 4.00. Après 24 h d'évolution, et pour l'ensemble des isolats, un pH moyen de 3.50 est atteint où la valeur la plus basse (3.03) et la plus haute (3.95) ont été enregistrées par *Aerococcus sp.* Lbm19 et *Enterococcus sp.* Lbm49 successivement. Le pH a repris une hausse brutale dans les 24 h qui suivent pour revenir presque aux valeurs initiales dans les 48 h de croissance (**Tableau 4.4 et Figure 4.6**).

Tableau 4.4 : Résultats du suivi cinétique du pH

Isolats lactiques	Temps (h)						
	2h	6h	12h	18h	24h	48h	
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	6.33	6.2	4.03	3.8	3.4	5.79
	Lbm10	6.17	5.6	4.2	3.8	3.43	6.27
	Lbm17	6.35	6.2	4.48	4	3.59	6.2
	Lbm18	6.36	6.3	4.46	4	3.5	5.75
	Lbm19	6.39	6.2	4.48	3.7	3.03	6.01
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	6.39	6.1	4.71	4.1	3.93	6.1
	Lbm47	6.46	6.2	4.73	4.2	3.51	6.2
	Lbm49	6.4	6.2	4.77	4.1	3.95	6.08
	Lbm50	6.41	6.1	4.31	3.8	3.65	5.6
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	6.4	6.2	4.33	3.8	3.68	6.2

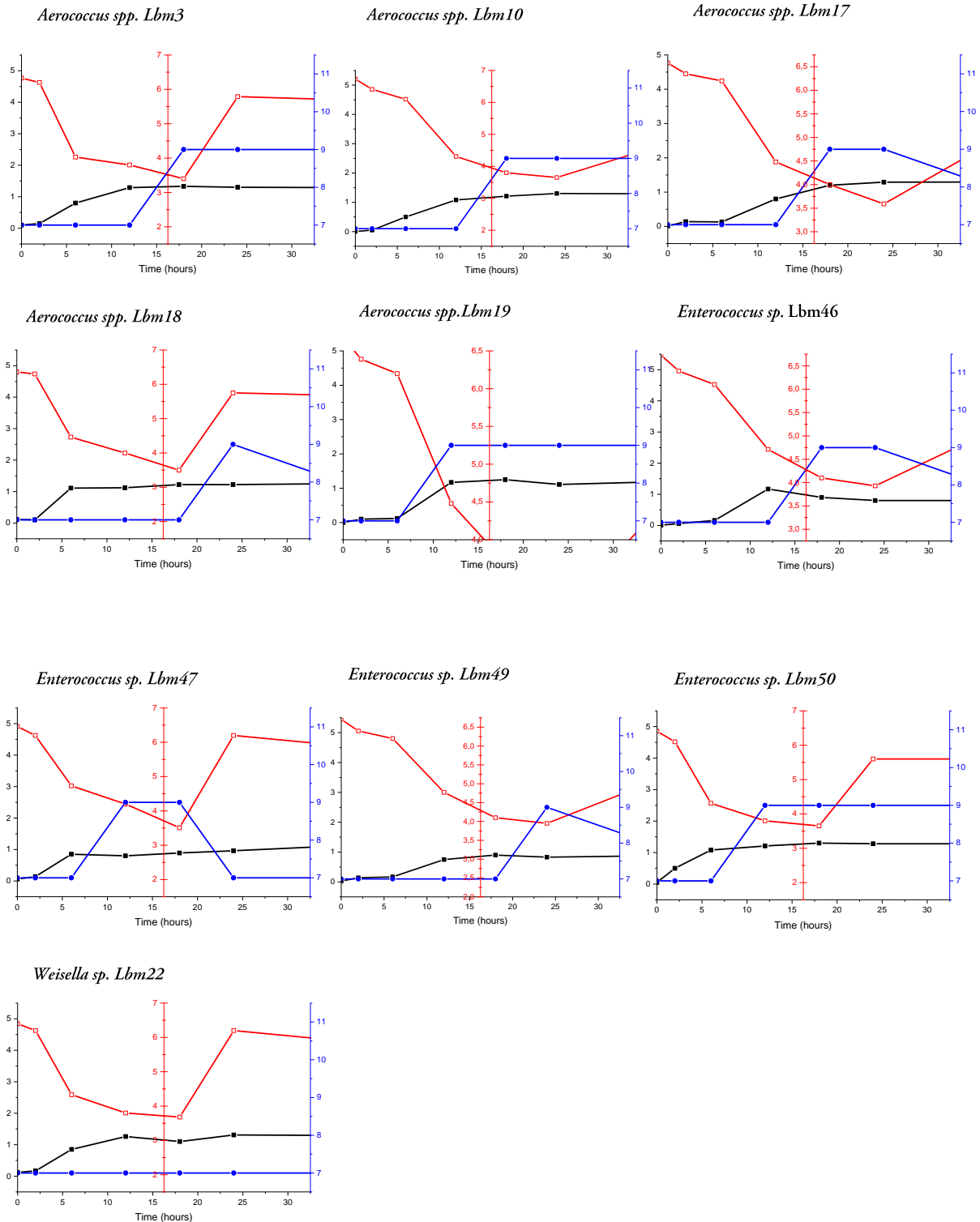


Figure 4.6 : Résultats de l'activité antimicrobienne ; (□) acidité (pH), (■) suivi cinétique de croissance (DO 620 nm), et (●) activité bactériocénogénique anti-*St. aureus* ATCC 25923

– **Sensibilités, lysogénie et quantification des bactériocine** : les bactériocines prétendues être secrétées par *Aerococcus sp.* Lbm10, *Enterococcus sp.* (Lbm46 et 50) ont démontré une thermorésistance aux quatre barèmes de temps/température exprimée par une activité antagoniste positive essentiellement à l'encontre de *St. aureus* suivi d'*Aerococcus sp.* (Lbm18 et 19) et *Weisella sp.* Lbm22 qui ont défailli à surmonter le dernier barème mais ayant agi en plus de *St. aureus* ATCC 25923 sur *B. cereus* ATCC 11778. Cependant, le reste des surnageants a été quasiment thermosensible (**Figure 4.7**). S'agissant de la quantification des bactériocines, exprimée par une activité inhibitrice de la croissance des pathogènes cibles, après une série de dilutions *two folds*, a abouti à qualifier la plus concentrée ; la bactériocine d'*Enterococcus sp.* Lbm46 contre *B. cereus* ATCC 11778 suivie par celle d'*Enterococcus sp.* Lbm50 décelée contre *St. aureus* ATCC 25923 avec des concentrations de 1.59 UA/mL (1/64) et de 1.56 UA/mL (1/16) successivement. Une concentration de 6.25 UA/mL (1/4) est attribuable à la bactériocine d'*Aerococcus sp.* Lbm10 détectée sur la croissance de *L. ivanovii* ATCC 19119. Quant au traitement des surnageants par les enzymes protéolytiques prévoyant la proscription d'une éventuelle activité antagoniste par la bactériocine a permis de dévoiler une persistance de l'effet inhibiteur avec les surnageants d'*Aerococcus sp.* Lbm10 et *Enterococcus sp.* Lbm46 tous deux contre *Cl. perfringens* CECT 486 et *St. aureus* ATCC 25923 et séparément à l'encontre de *L. ivanovii* ATCC 19119 et *B. cereus* ATCC 11778 respectivement. Cependant, les surnageants d'*Aerococcus spp.* (Lbm18 et 19) ont donné une zone d'inhibition contre *B. cereus* ATCC 11778 et *St. aureus* ATCC 25923 successivement ; deux bactéries cibles ayant affiché une sensibilité à *Enterococcus sp.* Lbm50 et *Weisella sp.* Lbm22 dans cet ordre. Par ailleurs, aucune activité n'a été détectée pour le reste des surnageants relevant des *Aerococcus spp.* (Lbm3 et 17) et *Enterococcus spp.* (Lbm47, 49) (**Figure 4.7**).

4.4.2 Caractérisation des propriétés technologiques

– **Thermorésistance** : tous les isolats testés ont montré une culture négative après le traitement thermique à 60 °C pour une demi-heure (**Tableau 4.5, Figure 4.7**).

– **Pouvoir lipo-, protéo- et amylolytique** : pour le pouvoir lipolytique, les isolats lactiques n'avaient aucun effet perceptible vis-à-vis de la source lipidique, ce qui permet de les qualifier lipolyse négatifs (**Tableau 4.5, Figure 4.7**). S'agissant du pouvoir protéolytique investigué sur les

trois concentrations 1, 2 et 10 % de lait écrémé, l'ensemble des isolats exhibent un pouvoir à dégrader la source protéique avec des diamètres allant de 22 à 17 mm plus prononcés et mieux perçus avec la concentration de 2 % (diamètre du spot inclus) pour *Aerococcus spp.* (Lbm3, 10, 17 et 18), *Enterococcus sp.* Lbm50, et *Weisella sp.* Lbm22 suivis, avec des diamètres compris entre 15 et 10 mm, d'*Enterococcus spp.* (Lbm46, 47 et 49) et *Aerococcus sp.* Lbm19. Cependant la concentration de 10 % a été caractérisée par la réduction proportionnelle des diamètres, tandis que la concentration de 1 % n'a pas laissé percevoir aucune activité (**Tableau 4.5, Figure 4.7**). En ce qui est de l'amylolyse, tous les isolats lactiques sur 3 % d'amidon, ont formé des colonies sans zone de lyse à détecter (**Tableau 4.5, Figure 4.7**).

– **Production des EPS et d'acétoïne** : la production des EPS marquée par des colonies volumineuses et gluantes (formation de pellicule opaque à la surface de gélose) a été nettement prononcée avec *Aerococcus sp.* Lbm10 et l'était légèrement pour *Enterococcus sp.* Lbm50 parmi les dix isolats lactiques testés (**Tableau 4.5, Figure 4.7**). La production d'acétoïne s'exprimant par l'apparition d'un anneau et/ou la diffusion de la couleur rose à la surface des microtubes après la révélation par l'addition de quelques gouttes de réactifs VPI et VPII a été présentée dans un classement d'importance chez *Aerococcus sp.* Lbm3, *Enterococcus spp.* (Lbm47, 49 et 50) suivis d'*Aerococcus sp.* Lbm18 et d'*Enterococcus spp.* Lbm46. Alors qu'elle a été négative pour les autres isolats lactiques ; *Aerococcus spp.* (Lbm10, 17 et 19) et *Weisella sp.* Lbm22 (**Tableau 4.5, Figure 4.7**).

Tableau 4.5 : Résultats du pouvoir lipo-, protéo- et amylolytique ; de la production d'EPS et d'acétoïne ; et de la thermorésistance

Isolats lactiques	Thermo résistance à 60 °C/30 min	Amylolyse amidon à 2%	Protéolyse* Lait écrémé à			Lipolyse Tween 80 à		Acétoïne	EPS Saccharose à 10%
			1%	2%	10%	1%	3%		
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	-	-	22	20	-	-	+	-
	Lbm10	-	-	19	15	-	-	-	(+)
	Lbm17	-	-	18	15	-	-	-	-
	Lbm18	-	-	21	18	-	-	+	-
	Lbm19	-	-	12	10	-	-	-	-
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	-	-	14	10	-	-	+	-
	Lbm47	-	-	13	11	-	-	+	-
	Lbm49	-	-	11	9	-	-	+	-
	Lbm50	-	-	19	14	-	-	+	(+)
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	-	-	17	11	-	-	-	-

- : réaction négative ; (+) : colonies gluante et volumineuse.

*: moyenne du diamètre de la zone de lyse en millimètre.

4.4.3 Caractérisation des propriétés fonctionnelles

– **Tolérance à l'acidité** : les isolats lactiques ont exprimé une meilleure résistance aux pHs acides avec généralement une légère affection de la viabilité par le pH 2 que par le pH 3 avec des taux de survie largement supérieurs à 76.58 %. Cela est clair chez presque tous les isolats lactiques testés ; de 82.83 % à 92.56 % pour *Aerococcus spp.* et de 93.16 % à 97.09 % pour *Enterococcus spp.* et avec 76.58 % pour *Weisella sp.* Lbm22. La diminution de la viabilité cellulaire était inférieure à 1 unité log (UFC/mL) pour tous les isolats lactiques et de 1 à 2 unités log (UFC/mL) exceptionnellement pour *Aerococcus spp.* (Lbm18 et 19) et *Weisella sp.* Lbm22 (Tableau 4.6, Figures 4.7 et 4.8).

– **Réduction du cholestérol** : le taux d'assimilation du cholestérol par les isolats lactiques s'est placé dans l'intervalle de 89 à 97 % (Tableau 4.6, Figures 4.7 et 4.8).

Tableau 4.6 : Résultats des taux de survie dans les conditions acides et assimilation du cholestérol

Isolats lactiques	PBS à pH 2			PBS à pH 3		MRS avec 50 µg/mL de Cholestérol	
	t0	t1	%	t1	%	%*	
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	8.42 ± 0.39	7.76 ± 0.32	92.17	8.27 ± 0.10	98.18	97.91 ± 1.67
	Lbm10	9.03 ± 0.32	8.36 ± 0.22	92.56	8.79 ± 0.35	97.33	91.66 ± 0.70
	Lbm17	9.16 ± 0.23	8.42 ± 0.35	91.85	8.53 ± 0.40	93.12	93.74 ± 1.30
	Lbm18	8.76 ± 0.21	7.26 ± 0.07	82.83	8.00 ± 0.02	91.33	95.83 ± 2.21
	Lbm19	8.42 ± 0.35	7.26 ± 0.73	86.22	7.95 ± 0.60	94.52	91.66 ± 0.87
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	8.48 ± 0.21	8.23 ± 0.35	97.09	8.42 ± 0.30	99.27	89.57 ± 0.98
	Lbm47	8.73 ± 0.12	8.42 ± 0.46	96.37	8.65 ± 0.27	99.09	93.74 ± 1.13
	Lbm49	8.56 ± 0.19	8.15 ± 0.74	95.21	8.40 ± 0.24	98.15	95.83 ± 1.55
	Lbm50	8.81 ± 0.35	8.20 ± 0.05	93.16	8.60 ± 0.31	97.68	89.57 ± 1.43
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	8.85 ± 0.19	6.78 ± 0.83	76.58	7.85 ± 0.37	88.63	93.74 ± 1.10

t0 : temps initial, t4 : après 4h d'incubation.

% : pourcentage des survivants des isolats lactiques (log UFC).

%* : pourcentage du cholestérol assimilé.

valeurs représentent la moyenne ± déviation standard.

– **Résistance aux conditions gastriques et intestinales simulées :** si vue en juxtaposition, les conditions gastriques et les conditions intestinales simulées laissent entrevoir une grande divergence à être supportées par les isolats lactiques examinés. Les taux de survie ont été coincés entre 93.91 % et 99 % pour les premières (gastriques) et entre 92.15 % et 99 % pour les secondes. D'autres taux sont valables pour les dix isolats lactiques en question. La diminution de la viabilité cellulaire était moins de 1 unité log (UFC/mL) (Tableau 4.7, Figures 4.7 et 4.8).

Tableau 4.7 : Résultats des taux de survie dans les conditions gastriques et intestinales simulées

Isolats lactiques	Gastriques Solution saline avec 3 mg/mL de pepsine à pH 3			Intestinales Solution saline avec 3 mg/mL de sels biliaires à pH 8			
	t0	t1	%	t0	t1	%	
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	10.44 ± 0.46	10.32 ± 0.50	98.80	10.74 ± 0.95	10.66 ± 0.54	99.28
	Lbm10	10.55 ± 0.54	10.17 ± 0.25	96.35	10.70 ± 0.52	10.26 ± 0.79	95.93
	Lbm17	10.55 ± 1.09	10.22 ± 0.51	96.88	10.53 ± 0.30	10.45 ± 0.39	99.24
	Lbm18	10.34 ± 1.07	10.45 ± 0.43	101.01	11.27 ± 0.37	10.38 ± 0.64	92.15
	Lbm19	10.65 ± 0.66	10.64 ± 0.60	99.88	10.65 ± 0.69	10.59 ± 0.43	99.48
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	10.52 ± 0.39	9.98 ± 0.51	94.86	10.64 ± 0.32	10.41 ± 0.56	97.84
	Lbm47	10.66 ± 0.15	10.16 ± 0.40	95.30	10.63 ± 0.58	10.41 ± 0.03	97.91
	Lbm49	10.69 ± 1.27	10.04 ± 0.46	93.91	11.18 ± 0.58	10.33 ± 0.04	92.43
	Lbm50	10.45 ± 1.07	10.13 ± 0.05	96.97	10.95 ± 0.98	10.44 ± 0.04	95.34
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	10.60 ± 0.01	10.42 ± 0.65	98.36	10.95 ± 0.90	10.26 ± 0.04	93.62

t0 : temps initial, t1 : après 4h d'incubation.
 % : pourcentage des survivait des isolats lactiques (log UFC).
 valeurs représentent la moyenne ± déviation standard.

4.4.4 Caractérisation des propriétés sécuritaires

– **Hémolyse et gélatinase** : l'étude de l'activité hémolytique a été réalisée pour la détection et la détermination du type d'hémolyse. Les zones d'hémolyse ont été manifestées comme suit : α -hémolyse (zone verdâtre autour des colonies) pour les sept isolats lactiques ; *Aerococcus spp.* (Lbm10, 17, 18 et 19) *Enterococcus spp.* (Lbm46, 47 et 49) et γ -hémolyse (aucune zone de lyse) pour les trois autres ; *Aerococcus sp.* Lbm3, *Weisella sp.* Lbm22 et *Enterococcus sp.* Lbm50 (Tableau 4.8, Figure 4.7). Les deux expressions renseignent sur une absence de l'activité hémolytique chez l'ensemble des isolats. De même, le dépistage de l'activité gélatinase, aucun isolat n'a été détecté comme positif (colonies dépourvues de halos de lyse perceptibles) (Tableau 4.8, Figure 4.7).

– **Hydrolase des sels biliaires** : l'activité de l'hydrolyse des sels biliaires n'a enregistré aucune zone de lyse aux limitrophes des spots (Tableau 4.8 et Figure 4.7).

– **Résistances aux antibiotiques** : la multi-tolérance (résistance) des isolats lactiques testée à l'égard de onze (11) antibiotiques permet de l'interpréter selon deux points de vue : des antibiotiques tolérés envers les isolats et dans le sens inverse (des isolats résistants envers les

antibiotiques correspondants). Suivant ce dernier, l'indifférence aux antibiotiques a concerné huit (8) à onze antibiotiques (11) testés ce qui a donné des coefficients de sensibilité de 0.72 et 0.90. Cette sensibilité a été constatée sauf pour la vancomycine et le sulfaprim (**Figures 4.7 et 4.8**).

Tableau 4.8 : Résultats d'hydrolase des sels biliaires, gélatinase et hémolyse

Isolats lactiques		BSH à 0.5 % sels biliaires + 0.037 % CaCl ₂	Hémolyse à 5 % sang	Gélatinase à 3 % gélatine
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	-	γ	-
	Lbm10	-	α	-
	Lbm17	-	α	-
	Lbm18	-	α	-
	Lbm19	-	α	-
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	-	α	-
	Lbm47	-	α	-
	Lbm49	-	α	-
	Lbm50	-	γ	-
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	-	γ	-

- : négatif ; + : 1 mm de diamètre.

α : hémolyse de type α ; γ : hémolyse de type γ.

4.4.5 Potentiel technologique et probiotique cumulé

Les isolats *Enterococcus sp.*Lbm49, *Aerococcus sp.* Lbm19, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46, *Aerococcus sp.* Lbm3 et *Enterococcus sp.* Lbm50 ont prouvé les plus haut potentiels probiotiques et technologiques plus de 55 %. En sus, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46 et *Enterococcus sp.* Lbm49 ont révélé les meilleures propriétés technologiques. Le taux de croissance spécifique maximum (μ_{max}) ont été de 1.667, 0.145, 0.730, 1.986, 0.728 et 1.440 respectivement pour les isolats élus (**Tableau 4.7, Figure 4.8**).

Tableau 4.9 : Potentiel technologique et probiotique, et taux de croissance

Isolats lactiques		Potentiel technologique & probiotique %	Taux de croissance spécifique maximum (μ max)
<i>Aerococcus spp.</i>	Lbm3	56	0.728
	Lbm10	51	0.285
	Lbm17	48	0.664
	Lbm18	58	0.730
	Lbm19	60	0.145
<i>Enterococcus spp.</i>	Lbm46	57	1.986
	Lbm47	50	0.761
	Lbm49	62	1.667
	Lbm50	55	1.440
<i>Weisella sp.</i>	Lbm22	50	1.429

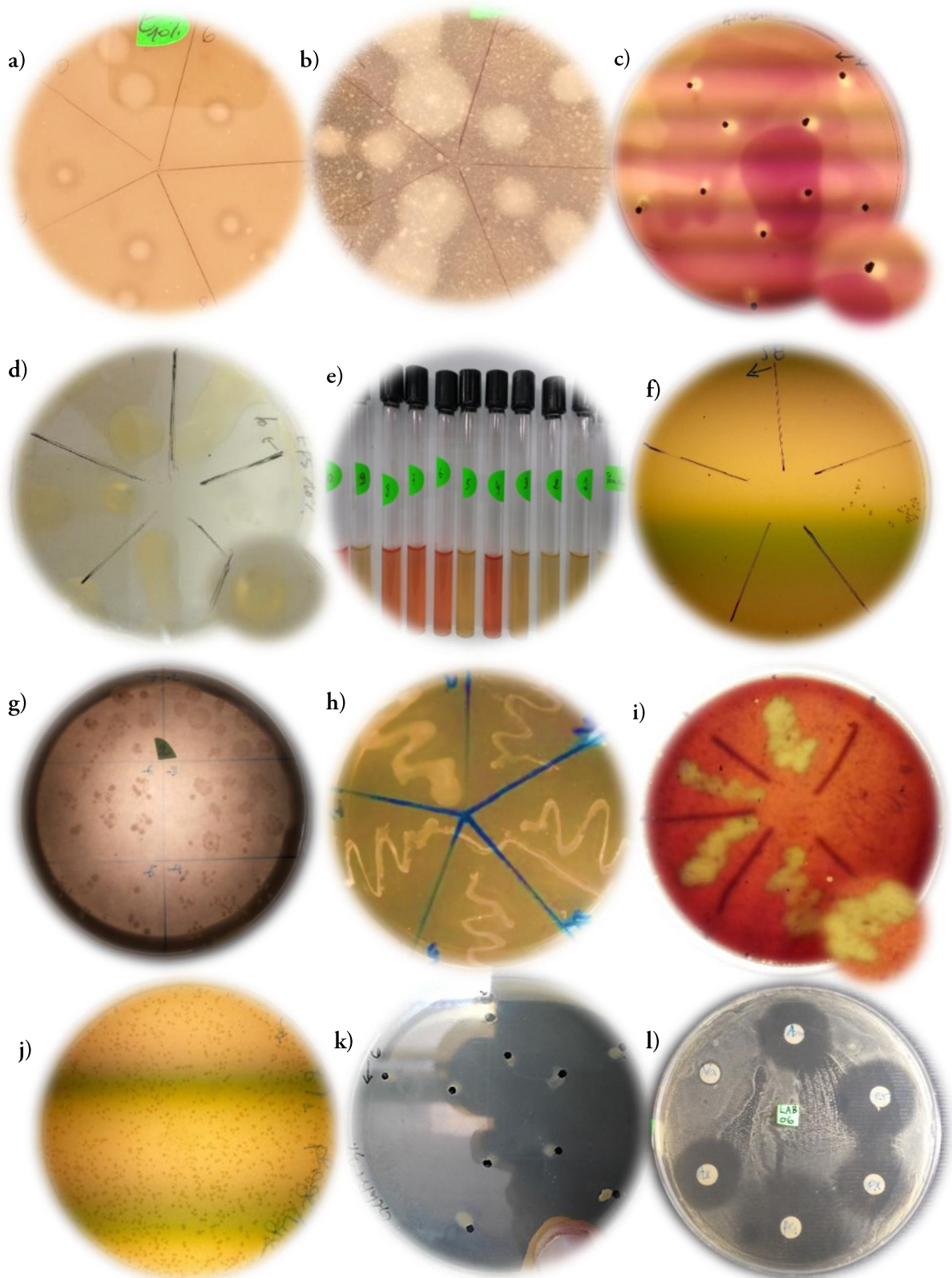


Figure 4.7 : Résultats de la capacité ; (a) lipo- ; (b) protéo- ; (c) amylolytique ; (d) EPS ; (e) acétoïne ; (f) thermorésistance ; (g) survie dans les conditions acides, gastriques et intestinales ; (h) sels biliaires ; (i) hémolyse ; (k) gélatine ; et (l) résistances aux antibiotiques

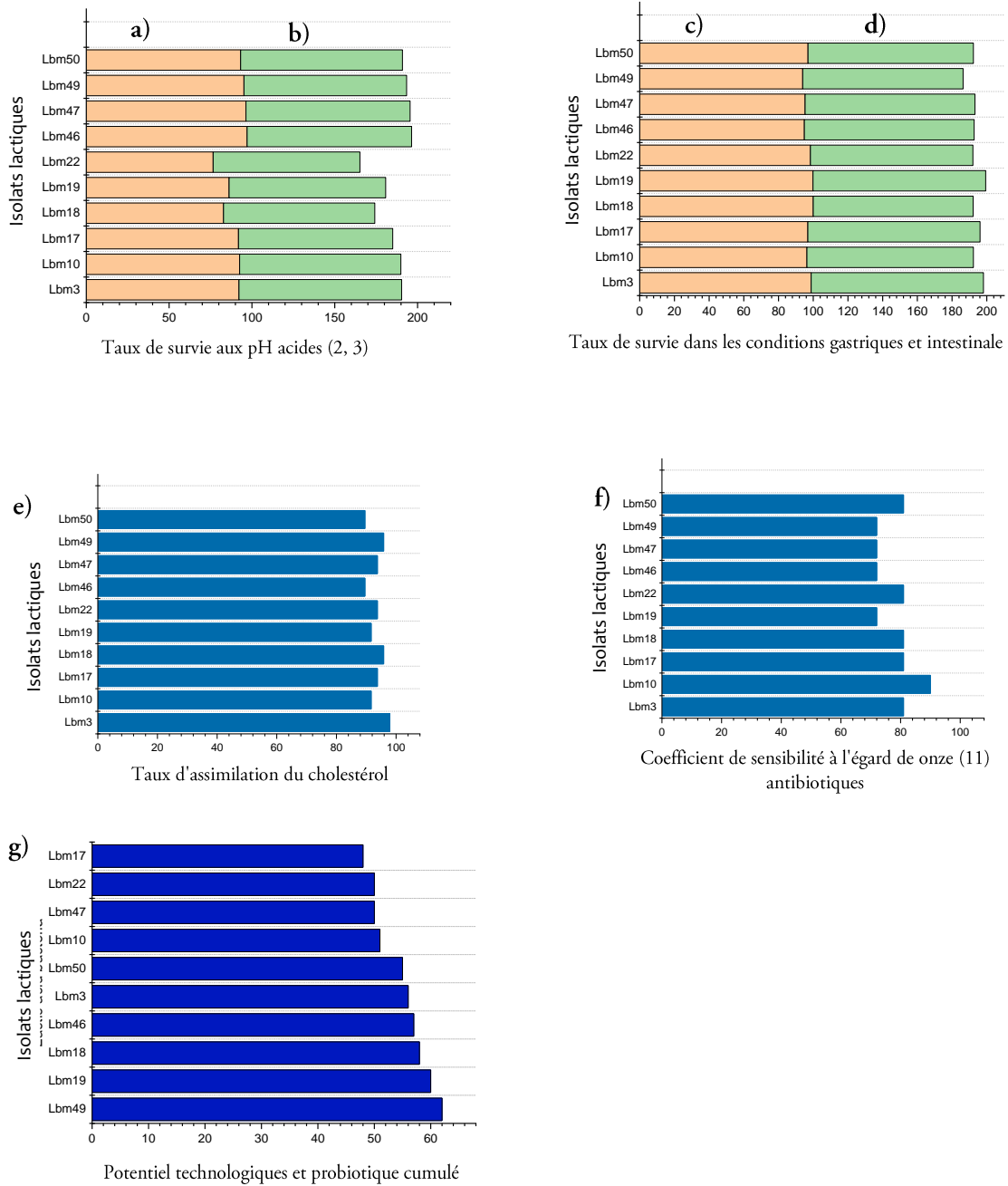


Figure 4.8 : Résultats des taux de survie dans des conditions : (a) pH 2, (b) pH 3, (c) gastrique, (d) intestinales ; (e) taux assimilation du cholestérol ; et (f) coefficient de sensibilité à l'égard des antibiotiques ; (g) Potentiel technologiques et probiotique cumulé

4.1 Discussion

Selon les exigences de la FAO et l'OMS, ainsi que d'autres recommandations de l'EFSA, cette partie a été menée dans l'objectif de screener *in vitro* le potentiel probiotique et technologique de dix (10) isolats de bactéries lactiques à action inhibitrice prometteuse, obtenus lors des travaux de la première partie à partir de *Guedid*, un produit ethnique de l'Afrique du Nord préparé à partir de la viande par l'action combinée de salage et séchage (Gagaoua & Boudechicha, 2018 ; Boudechicha *et al.*, 2017). Les isolats ainsi définis appartiennent aux genres : *Aerococcus spp.* (Lbm3, 10, 17, 18 et 19), *Enterococcus spp.* (Lbm46, 47, 49 et 50) et *Weisella sp.* Lbm22 et ont été soumis à une série d'épreuves comprenant : (i) la capacité inhibitrice de pathogènes à gram positif et le suivi cinétique de croissance, de pH et de production de l'agent inhibiteur (y compris la lysogénie, la sensibilité aux températures et aux enzymes) ; (ii) la caractérisation des propriétés technologiques qui peuvent être indéniables et parfois très importantes comme la lipo-, la protéo- et l'amilolyse, ainsi que la production des EPS et d'acétoïne ; (iii) la caractérisation des propriétés fonctionnelles comme la résistance à diverses agressions rencontrées dans le tube digestif (acidité, bile, conditions gastriques et intestinales), la capacité d'adhérence aux cellules épithéliales ou à du mucus, la capacité de réduction du cholestérol ; et en dernier (iv) la caractérisation des propriétés sécuritaires, à savoir l'hémolyse, la gélatinase, et l'antibio susceptibilité.

Les probiotiques selon l'ISAPP sont « *des organismes vivants, qui procurent un avantage à l'hôte lorsqu'ils sont fournis en quantité suffisante* » (de Oliveira, 2018 ; Gasbarrini *et al.*, 2016). Une définition similaire selon la FAO et l'OMS portant les même propos, les qualifie comme « *des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent un avantage en termes de santé à l'hôte* ». En sus, est considéré comme probiotique, tout microorganisme ne présentant ni toxicité, ni pathogénie, c'est pour cela, ces microorganismes sont reconnus comme des agents de garde alimentaire (*Food garde*), labelés ainsi avec le statut *GRAS*, le statut de présomption d'innocuité reconnue avec la mention *QPS (Qualified Presumption of Safety)* et la mention *ProSafe*. Fraichement, les probiotiques forment deux générations ; une première incluant le groupe de genres des bactéries lactiques, le genre *Bifidobacterium* et d'autres Levures, tandis que

la seconde a rajouté d'autres microorganismes tels que le genre *Bacillus*, des *Archaeobacteria*, et des *Enterobacteria*.

Un microorganisme probiotique doit répondre à un minimum de critères pour cette qualification et doit conférer des bienfaits à la santé de l'hôte. Par ricochet, il doit : (i) être tolérant au stress de bile, des conditions acides, gastriques et intestinales ; (ii) avoir une habilité d'adhérer à la surface de la muqueuse et aux cellules intestinales (hydrophobicité) et capable d'auto-agrégé ; (iii) avoir une activité anti pathogène et un pouvoir de co-agrégé avec les pathogènes ainsi que de rivaliser le microbiote intestinal, persister et se multiplier et résister aux spermicides pour les probiotiques à usage vaginal ; (iv) être sain, non toxique, non invasif, non allergogène, non mutagène, non carcinogène, non hémolytique, non résistant aux antibiotiques (transfert de gènes) et avoir une identification taxinomique concise ; (v) métaboliser le cholestérol et le lactose, être éligible du point de vue industrielle (pouvoir texturant, aromatisant et acidifiant) sans affecter les qualités sensorielles des produits (de Melo Pereira *et al.*, 2018 ; Morelli & Capurso, 2012 ; EFSA, 2004 ; FAO/OMS, 2002).

Ces microbes bénéfiques sont essentiellement utilisés comme aliments, compléments alimentaires, ingrédients alimentaires, aliments médicaux et récemment comme médicaments pour améliorer la santé humaine et le traitement de certains troubles métaboliques et désordres gastro-intestinaux. Cela est dû à leur capacité à inhiber les microbes maléfiques (Mokoena, 2017 ; Urdaci *et al.*, 2004). Cette inhibition est liée à la production d'acides organiques et de divers autres métabolites, bactériocines principalement (Izuchukwu, 2017 ; Hor & Liong, 2014 ; Lairini *et al.*, 2014 ; Guarner *et al.*, 2011). En effet, des études ont démontré les bienfaits des bactéries lactiques sur la santé humaine et animale, en tant que probiotiques (FAO, 2006). Ils comprennent la prévention de la diarrhée, des maladies inflammatoires de l'intestin, des infections urogénitales, de l'intolérance au lactose, de la réduction du taux de cholestérol, du cancer du côlon, de la régulation de l'équilibre du microbiote intestinal, de la prévention des allergies, de l'amélioration du système immunitaire, de la bio-disponibilité des nutriments et l'absorption du calcium (Angmo *et al.*, 2016 ; Tokatlı *et al.*, 2015). Ils peuvent éventuellement stimuler le système immunitaire par la production de mucine et empêcher l'implantation d'agents pathogènes. Le profil de sensibilité aux antibiotiques

est un paramètre indispensable pour tout candidat lactique, pour exclure la transférabilité de l'antibiorésistance aux bactéries commensales ou pathogènes présentes dans l'intestin (Zhang *et al.*, 2018 ; Sanders, 2011 ; Foligne *et al.*, 2013).

Etant donné que l'activité antimicrobienne représente le critère essentiellement recherché associant l'inhibition de la croissance des pathogènes et l'habilité d'attachement et de persistance au niveau du site d'action, l'intestin (FAO/OMS, 2002). Cette activité attribuée aux plusieurs genres du groupe lactique et principalement orientée envers des pathogènes alimentaires et responsables d'infections cliniques via la production des acides organiques, des bactériocines et des *bacteriocin-like substances*. Lors de la présente étude, le suivi de croissance des isolats lactiques dans un milieu liquide non renouvelé a été accompagné par mesure de la cinétique d'évolution de trois paramètres conséquents et, à la fois, indicateurs de celle-ci. Ces paramètres font référence à la DO, le pH et les substances inhibitrices (bactériocines) et sont quantifiés à t_0 et au bout de 2, 6, 12, 18, 24, et 48 heures d'incubation de cultures lactiques. L'évolution de la croissance a tracé des courbes comprenant ; une phase plateau (4 h), avec un pic de croissance exponentielle (entre 6 et 12 h), et une phase stationnaire (entre 12 et 18 h). Le maximum de l'activité inhibitrice des surnageants bruts de tous les isolats lactiques a été enregistré à 24 h. Les isolats d'*Aerococcus spp.* (Lbm3, 17, 18) et d'*Enterococcus sp.* Lbm50 ont donné des diamètres d'inhibition d'au moins 9 mm contre *St. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, et *L. ivanovii* ATCC 19119. *St. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC11778 étant les plus sensibles et *Cl. perfringens* CECT 486 étant le moins sensible. Les bactéries lactiques sont trouvées aptes à inhiber la croissance des pathogènes à gram positif avec des diamètres d'inhibition variables d'une étude à l'autre. Naimi & Khaled, (2014), ont constaté que *St. aureus* demeure le germe le plus sensible suivie de *B. cereus*. La sensibilité de *St. aureus* a été de même remarquée par Abid & Khaled, (2018) suivi en deuxième degré par *L. ivanovii* et *B. cereus*. A cet égard, Musikasang *et al.*, (2012) et Musikasang *et al.*, (2009) ont constaté des évolutions marquées par une phase plateau (6 h), une phase exponentielle se situant entre 6 à 12h et une phase stationnaire maintenue entre 12 à 18 h, ceci avec des activités inhibitrices atteignant les 12 à 24 mm sensiblement contre *St. aureus*. De même, Monteagudo, *et al.*, (2011) ont énoncé des évolutions avec une phase d'accélération vers 10 à 12 h, une phase de croissance exponentielle entre 12 et 18 h puis un plateau à partir de 20 h et ont rapporté une activité

antimicrobienne déclenchée à 5 h pour se conserver jusqu'à 17 à 21 h après. Dans l'étude de **Dhewa et al. (2010)**, des diamètres d'inhibition de 10 à 12 mm par des Lactobacilli ont été notés contre des pathogènes de type de paroi gram positifs comme *En. faecalis*, *St. aureus* et *B. cereus*. En addition, **Angmo et al., (2016)** ont trouvé des zones d'inhibition de l'ordre 5 mm dirigée contre *B. cereus*, *St. aureus* et *Shigella dysenteriae*. S'ajoute à cela, les trouvailles de **Maragkoudakis et al., (2009)** ont montré que des surnageants neutralisés récoltés des espèces d'*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont exhibé un effet anti-*Listeria* avec 18 mm, et à l'égard d'autres microorganismes de type de paroi gram positif comme *Brochothrix spp.* avec 8 mm et anti *B. cereus* et *Cl. perfringens* avec 2 et 1 mm, respectivement. Les résultats concernant le suivi de l'évolution de pH soulignent que les dix isolats lactiques sont doués d'un important pouvoir acidifiant par accumulation des acides au cours de la fermentation. Parmi eux l'acide lactique, et cela après avoir enregistré un pH moyen de 3.50 sur l'échelle de *Soren Sorensen*. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Hanchi et al. (2014)** et **Benreguieg et al. (2013)** où un pH de 2 à 3 a été affiché au pic d'acidification correspondant à une phase stationnaire placée entre 12 et 18 h accompagnée de l'intensification de l'effet inhibiteur. Un début de bactériocinogène a été constaté par **Benreguieg et al., (2013)** à 15 h d'incubation et dont l'effet a été noté essentiellement contre un seul germe, *B. cereus* ATCC 11778. Une chute de pH, aux seuils très similaires avec des valeurs concentrées autour du pH 2 à 24 h de croissance, a été enregistrée chez les souches étudiées par **Musikasang et al., (2012)**.

A côté du traitement par neutralisation des surnageants bruts, et en vue de prouver l'implication seule des bactériocines dans l'effet antimicrobien des isolats lactiques, le test de la lysogénie n'a détecté aucune inhibition due à la présence de phages. La plupart des études élimine une telle activité. Par la suite, les éventuelles bactériocines ont été testées pour trois points d'aboutissement dont le premier est de prouver leur nature protéique, le deuxième de déterminer leurs doses et le troisième de qualifier à quel point résistent-elles à différentes hautes températures. Il s'est avéré à l'issue des trois tests que les surnageants des isolats lactiques supposés contenir les bactériocines n'ont montré aucune activité considérée comme positive vis-à-vis des quatre (4) souches pathogènes après traitement à 100 °C durant 10, 30, 60 min et 120 °C durant 15 min et ni après soumise à l'action des enzymes (pepsine et α -chymotrypsine). Une telle sensibilité peut

prédire le caractère protéique de l'agent inhibiteur (Musikasang *et al.*, 2012). Le traitement par les enzymes protéolytiques appliqué par Mechai *et al.*, (2014) concernait l' α -chymotrypsine avec, en parallèle, deux autres ayant tous les trois atténué l'activité inhibitrice, prouvant ainsi la nature protéique de l'agent inhibiteur persistant (bactériocines). Toutefois, une résistance des bactériocines de neuf souches lactiques sur dix à l' α -chymotrypsine a été rapportée par Monteagudo-Mera *et al.*, (2011). Dans le même sens, Mechai *et al.*, (2014) ont assisté à une suppression de l'effet inhibiteur après un traitement thermique à 121 °C pendant 20 min chez une des onze souches lactiques testées. Par contraste, l'exposition des surnageants à différentes températures (80, 95, 110, et 121 °C pendant 10 min) effectuée par Naimi & Khaled, (2014) semble établir leur résistance aux traitements thermiques. La quantification des bactériocines exprimée par une activité inhibitrice de la croissance des cibles après une série de dilutions *two folds* a conduit à qualifier la plus concentrée la bactériocine d'*Enterococcus sp.* Lbm46 avec effet positif contre *B. cereus* ATCC 11778 suivie par celle d'*Enterococcus sp.* Lbm50 contre *St. aureus* ATCC 25923 avec des concentrations de 1.59 UA/mL (1/64) et de 1.56 UA/mL (1/16) successivement. Une concentration de 6.25 UA/mL (1/4) est attribuable à la bactériocine d'*Aerococcus sp.* Lbm10 dosée contre la croissance de *L. ivanovii* ATCC 19119. Des concentrations de bactériocines comprises entre 2.08 UA/mL (1/16) et 4.16 UA/mL (1/8) ont été détectées lors des essais de Naimi & Khaled, (2014).

Les approches de sélection et d'amélioration de nouvelles souches probiotiques incluent davantage des critères technologiques. L'action de la protéolyse et de la lipolyse sur la qualité sensorielle des produits est controversée, d'ailleurs, de Souza *et al.*, (2017) et Fadda *et al.*, (2001) ont mentionné que ces deux phénomènes constituent une part des événements biochimiques de développement de la saveur. Pour la protéolyse, par dégradation des acides aminés en donnant des composés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane, leucine, isoleucine et valine). Pour la lipolyse, les acides gras libres et les esters ainsi produits peuvent être transformés sous l'action des microorganismes dotés de systèmes enzymatiques (lipase et estérase) qui donne naissance à des composés de saveur (méthyl cétones, lactones, esters, alcools secondaires et aldéhydes). Aussi, la consommation des lipides bioactives comme l'acide linoléique conjugué et l'acide linoléique est associée avec des effets anticancer, antioxydants et hypo cholestérolémiants. Les dix isolats lactiques du présent travail ont présenté une activité protéolytique à 2 % du lait écrémé évaluée de 17 à 22

mm (diamètre du spot inclus) par *Aerococcus spp.* (Lbm3, 10, 17 et 18), *Enterococcus sp.* Lbm50, et *Weisella sp.* Lbm22. Cependant, aucune activité lipolytique (1 % et à 3 % du tween 80), protéolytique (1 et à 10 % du lait écrémé) et amylolytique (2 % d'amidon) ni une thermorésistance (60 °C/ 30min) n'ont été constatées. Des résultats identiques ont été rapportées dans de nombreuses études avec une lipo- et amilolyse négatives et une protéolyse positive de 1 mm à 35 mm (Mechai *et al.*, 2014 ; Musikasang *et al.*, 2012 ; Monteagudo *et al.*, 2011 Essid *et al.*, 2009 ; Musikasang *et al.*, 2009). Les neuf (9) isolats examinés par Musikasang *et al.*, (2012) ont présenté une digestion des protéines, 12 isolats testés par le même auteur Musikasang *et al.*, (2009) ont eu une digestion des protéines mais non pas des lipides et de l'amidon, de même que pour Mechai *et al.*, (2014), neuf (9) et trois (3) isolats parmi les onze (11) examinés avaient le pouvoir de digérer respectivement les protéines et les lipides, alors qu'une activité amylolytique qualifiée (+/-) était notée pour 6 isolats. Sur la même longueur d'onde, Duangchitchareon, (2006), Thongsom, (2004) et Kawai *et al.*, (1999) se prononcent que certaines souches des bactéries lactiques sont aptes d'utiliser les protéines, les lipides et l'amidon. Pour ce dernier, trois (3) souches parmi dix-neuf (19) étudiées étaient utilisateurs de l'amidon (Amal & Mohamed-Nasreddine, 2017). La restriction voire la non capacité de lyse des substrats sources de protéine (lait écrémé, gélatine) et de lipides (tween 80) communément utilisés *in vitro* sur gélose, n'est pas éligible vue que sa mise en évidence saurait beaucoup plus fructueuse et mieux perceptible *in vitro* sur des aliments modèles contenant des protéines et des lipides musculaires (Essid *et al.*, 2007 ; Mauriello *et al.*, 2004 ; Fadda *et al.*, 2001). Les techniques utilisées pour examiner la capacité de dégradation des protéines de viande par les bactéries lactiques peuvent utiliser soit des systèmes de viande aseptique contenant des protéines musculaires (sarcoplasmiques et myofibrillaires) ou bien l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pour évaluer la dégradation des grandes protéines ou bien la méthode fluorométrique (orthophtalaldéhyde) et chromatographie liquide à haute pression en phase inverse (RP-HPLC) pour analyser l'activité peptidase et les produits d'hydrolyse (peptides et acides aminés) (Fadda *et al.*, 2001).

Les bactéries lactiques sont connues pour leur pouvoir texturant lié à la production des EPS qui contribuent à l'amélioration de la consistance, la texture et la viscosité des produits alimentaires. Aussi, pour leur pouvoir aromatisant en produisant de l'acétoïne et d'autres substances par le

métabolisme du citrate (Welman & Maddox, 2003 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). De plus, Quinto *et al.*, (2014) mettent l'accent sur les bienfaits des EPS dans la résistance à l'acidité. Dans la même optique, de Souza *et al.*, (2017) citent les différentes utilisations des EPS dans la promotion de la rhéologie des aliments comme agents stabilisants, émulsifiants, gélifiants, à côté d'autres bienfaits incluant un effet antimutagène suite à une consommation alimentaire régulière. Dans la présente étude, les EPS à partir du saccharose (10 %) ont été élaborées par *Aerococcus sp.* Lbm10 et *Enterococcus sp.* Lbm50 et l'acétoïne par *Aerococcus spp.* (Lbm3 et 18), *Enterococcus spp.* (Lbm46, 47, 49 et 50). Selon Roger, (2010), les bactéries lactiques sont connues pour produire des EPS soit visqueux ou non visqueux. D'autre part, quatre isolats parmi les dix-neuf étudiés par Abid & Khaled, (2018) étaient positifs pour les EPS. Ainsi, les résultats de production d'acétoïne peuvent se comparer avec ceux de Abid & Khaled, (2018) dont quatre isolats sont acétoïne positifs. En contre pas, Amal & Mohamed-Nasreddine, (2017) signale que la production des arômes par les Lactocoques est moins importante que par les Lactobacilles.

Les critères d'évaluation du potentiel probiotique comprend aussi l'habilité à survivre lors du transit gastro-intestinal (Giraffa *et al.*, 2010), ainsi la résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires au niveau intestinal (Lähteinen *et al.*, 2010). Le pH bas de l'estomac oscille entre 2.5 et 3.5 et la concentration des sels biliaires avoisine les 1.5 à 2.0 % dans la première heure de la digestion avant de décroître à 0.3 % environ. La raison pour laquelle ces valeurs mêmes sont considérées comme standards pour évaluer la tolérance de ces environnements (Ashraf & Smith, 2016 ; Tokatlı *et al.*, 2015; Leite *et al.*, 2015; Dubey & Jeevaratnam, 2015). Cette dernière peut être testée en cultivant *in vitro* les microorganismes candidats dans des préparations stimulant lesdites conditions avec la présence des enzymes (pepsine, lysozyme, amylase), du phénol, du NaCl, d'Oxgall sels biliaires, et l'acide taurodésoxycholique. La tolérance est évaluée par dénombrement des cellules survivantes au moyen des techniques de comptage de colonies sur gélose ou par la mesure de l'absorbance à différents intervalles de temps (de Souza *et al.*, 2017 ; Divya *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2007; Maragkoudakis *et al.*, 2006). Les isolats lactiques examinés lors de cette pratique ont prouvé une meilleure résistance au pH 3 qu'au pH 2 et cela avec des taux de survie de 76.58, 82.83 et de 92.56 % pour *Aerococcus spp.* et de 93.16 % à 97.09% pour *Enterococcus spp.* et de 76.58% pour *Weissella sp.* La baisse de la viabilité cellulaire était inférieure à 1 unité log (UFC/mL)

pour tous les isolats lactiques et de 1 à 2 unités log (UFC/mL) exceptionnellement pour *Aerococcus spp.* (Lbm18 et 19) et *Weisella sp.* Lbm22. Par comparaison, de nombreuses récentes études rapportent la capacité de survie à pH bas. Une résistance à l'acidité arrivant à 100 % de taux de survie a été trouvée par Tokatlı *et al.*, (2015). Généralement, les bactéries lactiques résistent mieux aux conditions de pH au-dessus de 3, mais aussi au pH 8 en présence de bile, toutefois des taux de réduction variables ont été obtenus aux pH 1 à 2 par de nombreux chercheurs (Maragkoudakis *et al.*, 2009), à l'exemple de Tokatlı *et al.*, (2015) avec plus de 85 % à pH 2.5 et Leite *et al.*, (2015) avec une réduction de moins de 2 unités log (UFC/mL) par rapport au contrôle. Pour d'autres, un maximum de réduction de 4.8 unités log (UFC/mL) au pH 2 (Angmo *et al.*, 2016) et 3.3 unités log (UFC/mL) au pH 3 (Dhewa *et al.*, 2010).

Pour les conditions gastriques, des taux de survie coincés entre 93.91 % et 99 % et de 92.15 % et 99% pour leurs homologues intestinaux ont été exprimés par les dix isolats lactiques examinés, ce qui équivaut une réduction de viabilité cellulaire de moins de 1 unité log (UFC/mL) environ. Ces présents résultats sont en concordance avec ceux trouvés dans des études antérieures où la faible réduction témoignant la résistance élevée aux conditions simulant le passage gastro-intestinal (Hanchi *et al.*, 2014), aussi avec ceux rapportant une réduction approximative de l'ordre de 3 unités log (UFC/mL) dans un jus gastrique simulé. D'autres ont démontré une résistance aux conditions intestinales simulées de, respectivement, 40 % et de plus de 75 % pour les conditions gastriques et intestinales (Abid & Khaled, 2018 ; Dubey & Jeevaratnam, 2015 ; Hanchi *et al.*, 2014 ; Mechai *et al.*, 2014 ; Musikasang *et al.*, 2012). Il est impératif de souligner que 6 à 7 unités log (UFC/mL) ce qui est l'équivalent de la charge de 10^6 à 10^7 (UFC/mL) constituent le minimum restant en nombre des cellules probiotiques (dose efficace minimale) afin de conférer les bienfaits attendus (Ashraf & Smith, 2016 ; Angmo *et al.*, 2016 ; Quinto *et al.*, 2014).

Les bactéries lactiques peuvent réduire l'hyperlipémie en déclinant le taux sérique du cholestérol et le pouvoir de réduction du cholestérol peut être prédit *in vitro* par les taux d'assimilation de certains substrats comme le *cholesterol-phosphatidylcholine*, du MRS additionné avec du *phosphatidylcholine* ou du cholestérol hydrosoluble (*polyoxyethylene cholesteryl sebacate*) inoculé avec des candidats probiotiques et le taux d'assimilation sont mesurés par la méthode o-

phthalaldehyde (de Souza *et al.*, 2017 ; Pereira & Gibson, 2002). Les dix isolats lactiques test ont exprimé des taux d'assimilation placés dans l'intervalle de 89 à 97 %. Différents taux d'assimilation ont été cités dans la littérature scientifique en essayant des différentes concentrations de départ du cholestérol selon les protocoles et différentes souches test selon les études (Dubey & Jeevaratnam, 2015 ; Tokatlı *et al.*, 2015). Les présents isolats lactiques s'avèrent hautement prometteurs comparés avec 48.56 % comme meilleur taux enregistré par Angmo *et al.*, (2016) et Tokatlı, (2015).

Par ailleurs, les critères de sécurité requis pour une évaluation probiotique combinent la vérification de la gélatinase, BSH, le type d'hémolyse et la détermination du profil antibiotique. En l'occurrence, pour les isolats du présent travail, aucune zone de lyse de la gélatine (3 %) et de sels biliaires (0.5 %) n'a été décelée. Pour les sels biliaires, des études antérieures ont cité des résultats tantôt négatifs tantôt positifs en utilisant différentes concentrations de départ, où les résultats positifs ont été fréquemment observés avec de faibles concentrations (0.05, 0.10 et 0.30 %). En outre, le type d'hémolyse peut être influencé *in vitro* par la concentration et l'espèce du sang utilisé, ainsi que la gélose scène de la réaction et les conditions d'incubation, à propos de ce critère, deux expressions renseignant une absence de l'activité hémolytique (α et γ -hémolyse) ont été perçues sur gélose MH à 5 % du sang humain frais. Les bactéries lactiques à α -hémolyse sont considérées comme non hémolytiques (Rather *et al.*, 2015 ; Maragkoudakis *et al.*, 2009). De même, plusieurs travaux sur les probiotiques ont rapporté des résultats semblables (Angmo *et al.*, 2016 ; Yeong *et al.*, 2015 ; Leite *et al.*, 2015 ; Bizani & Brandelli, 2002). Dans la plupart des études, les bactéries lactiques candidates au statut probiotique sont exemptes de ces facteurs de virulence (Angmo *et al.*, 2016 ; Leite *et al.*, 2015). L'absence de tels facteurs est un indice présomptif de sécurité des cultures probiotique à l'égard de l'hôte (Monteagudo-Mera *et al.*, 2011; FAO/OMS, 2002).

La susceptibilité aux antibiotiques peut être étudiée par diverses techniques basées sur la diffusion sur gélose, la dilution ou les deux combinées. L'examen de l'antibiorésistance faisait l'objet d'une proposition par l'EFSA en 2004 avec l'éruption de la mention QPS et par la suite, toujours par la même autorité européenne en 2012 encadrée par une liste d'antibiotiques recommandés ; l'ampicilline, la vancomycine, le chloramphénicol, la gentamycine, la streptomycine, la

kanamycine, la tétracycline, l'érythromycine et la clindamycine (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2016). Pour le profil d'antibiogramme en cours d'exposition, l'indifférence (sensibilité) aux antibiotiques a concerné huit (8) à onze (11) antibiotiques testés conduisant à des coefficients de sensibilité de 0.72 à 0.90, cette sensibilité a été constatée sauf pour la vancomycine et le sulfaprim. Les présents résultats coïncident avec de nombreux tests à l'instar de ceux de Angmo *et al.*, (2016), Leite *et al.*, (2015) et Dubey & Jeevaratnam, (2015) qui ont montré que la résistance à la vancomycine et de Mathur & Singh, (2005) qui ont rapporté une faible résistance permettant aux candidats bactériens d'être éligibles aux critères requis et d'éviter le transfert de gènes de résistance au microbiote intestinal. Ceci est sans doute favorable pour une utilisation probiotique (Vera-Pingitore *et al.*, 2016). Néanmoins, plusieurs profils de résistance ont été attribués aux bactéries lactiques (Mathur & Singh, 2005 ; Danielsen & Wind, 2003 ; Temmerman *et al.*, 2002), par exemple, la résistance a été trouvée particulièrement vis-à-vis de l'érythromycine, la colistine, la vancomycine et la céftazidime (Angmo *et al.*, 2016) et vis-à-vis de la tétracycline, l'érythromycine, le chloramphénicol, la streptomycine et la vancomycine (Quinto *et al.*, 2014). Généralement, les bactéries lactiques probiotiques ont été déclarées résistantes aux aminoglycosides, aux quinolones et aux glycopeptides et sensibles à la pénicilline G, l'ampicilline, la tétracycline, l'érythromycine et le chloramphénicol (Hummel *et al.*, 2007).

En récapitulant, les dix isolats lactiques étudiés en particulier *Enterococcus sp.* Lbm49, *Aerococcus sp.* Lbm19, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46, *Aerococcus sp.* Lbm3 et *Enterococcus sp.* Lbm50 encaissent des scores de potentiel probiotique plus intéressants (jusqu'à 55 %). Davantage, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46 et *Enterococcus sp.* Lbm49 jouissent de meilleures propriétés technologiques. Ceci avec des vitesses de croissance spécifique de 1.667, 0.145, 0.730, 1.986, 0.728 et 1.440. Les μ_{max} ont été estimés par le modèle de Baranyi & Roberts (1994). La phase exponentielle peut être décrite quantitativement par le μ_{max} (Brown, 2007 ; Monod, 1949 ; Zwietering *et al.*, 1990). Les microorganismes probiotiques doivent posséder plusieurs caractéristiques entre autre un taux de croissance élevé (Reinberg, 2015 ; Chambers & Gong, 2011).

4.2 Conclusion

La présente investigation a été entreprise dans le but d'évaluer *in vitro* les critères probiotiques et technologiques selon les exigences minimales requises de la FAO/l'OMS et l'EFSA. Le screening d'isolats de bactéries lactiques obtenus à partir de *Guedid* nous a permis d'élire les isolats *Enterococcus sp.* Lbm49, *Aerococcus sp.* Lbm19, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46, *Aerococcus sp.* Lbm3 et *Enterococcus sp.* Lbm50 après avoir satisfait 48 % à 62 % du potentiel probiotique attendu par les tests entretenus, avec en plus des performances technologiques notamment leur pouvoir texturant et aromatisant qui peuvent intéresser l'opération industrielle. Ce potentiel probiotique mérite d'être achevé par des travaux complémentaires pour une identification parfaite (identification génétique), une purification des bactériocines et l'analyse de leurs structures chimiques ainsi que l'identification de leurs déterminants génétiques et enfin, des ECR pour comprendre et établir leurs intérêts sur des modèles animal et ou humain.

4.3 Références bibliographiques

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Abid, A., & Khaled, M. B. (2018). Évaluation de la capacité antimicrobienne du microbiote lactique de la viande salée et séchée ; Khliia. Mémoire de Magister en Sciences Vétérinaires : Hygiène et qualité des aliments d'origine animale, Université Ibn Khaldoun, Tiaret.
- Al Atya, A. K., Drider-Hadiouche, K., Ravallec, R., Silvain, A., Vachee, A., & Drider, D. (2015). Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Frontiers in Microbiology*, 6, 227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00227>
- Amalaradjou, M. A. R., & Bhunia, A. K. (2012). Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 67, pp. 185-239). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394598-3.00005-8>
- Amal, M. B., & Mohamed-Nasreddine, Z. (2017). Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel «Bouhezza».
- Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F., & Shah, N. P. (2006). Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 16(1), 40-51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.004>

- Andiç, S., Tunçtürk, Y., & Boran, G. (2015). Changes in volatile compounds of cheese. In Processing and impact on active components in food (pp. 231-239). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00028-7>
- Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-435 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>
- Anukam, K. C., & Reid, G. (2007). Probiotics: 100 years (1907–2007) after Elie Metchnikoff's observation. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 1, 466-474.
- Arévalo-Villena, M., Fernandez-Pacheco, P., Castillo, N., Bevilacqua, A., & Pérez, A. B. (2018). Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *LWT*, 89, 657-665. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.047>
- Ashraf, R., & Smith, S. C. (2016). Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains-tolerance to bile, pepsin and antibiotics. *International Food Research Journal*, 23(2), 777.
- Avram-Hananel, L., Stock, J., Parlesak, A., Bode, C., & Schwartz, B. (2010). E durans strain M4-5 isolated from human colonic flora attenuates intestinal inflammation. *Diseases of the colon & rectum*, 53(12), 1676-1686. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181f4b148>
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER*, 139, 1-66. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23(3-4), 277-294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Benreguiég, M., Dalache, F., & Gacemi, B. (2013). Characterization of antibacterial activity and potential as probiotic of lactic acid bacteria isolated from goat's milk in Algeria. *Journal of Life Sciences*, 7(8), 802. <https://doi.org/10.17265/1934-7391/2013.08.004>
- Bizani, D., & Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 512-519. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01720.x>
- Boudechicha, H. R., Nasri, I., Bennaceur, Z., Sellama, M., Hafid, K., Boudjellal, A., & Gagaoua, M. (2017). Microbiological changes during the preparation steps of Khliaa Ezir: a traditional cured meat product of Algeria. <https://doi.org/10.15761/IFNM.1000199>
- Brown, S. (2007). Two implications of common models of microbial growth. *ANZIAM Journal*, 49, 230-242. <https://doi.org/10.21914/anziamj.v49i0.340>

- Bultel, A. (2017). Les probiotiques aujourd'hui : Où en est-on. Thèse de Doctorat de docteur en pharmacie. Université de Lille 2.
- Bybee, S. N., Scorza, A. V., & Lappin, M. R. (2011). Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 856-860. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Casalta, E., Vassal, K., Desmazeaud, M. J., & Casabianca, F. (1995). Comparison of the Acidifying Activity of *Lactococcus lactis* Isolated from Corsican Goat Milk and Cheese. *Food Science and Technology-London*, 28(3), 291-299. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)94317-X](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)94317-X)
- Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International*, 44(10), 3149-3159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.017>
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International journal of food microbiology*, 149(3), 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of microbiological methods*, 56(1), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002>
- Chaskes, S., & Austin, R. (2015). Stains for light microscopy. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, Boca Raton, 45-60. <https://doi.org/10.1201/b17871-6>
- Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., & Antony, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401. <https://doi.org/10.1002/yea.3181>
- Cicienia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M., & Severi, C. (2014). Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *Journal of clinical gastroenterology*, 48, S18-S22. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000231>
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., ... & Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in microbiology*, 161(5), 372-382. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.006>
- Cuozzo, S. A., Sesma, F. J., Holgado, A. A. P. D. R., & Raya, R. R. (2001). Methods for the detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In *Food Microbiology Protocols* (pp. 141-146). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:141>

- Cutting, S. M. (2011). Bacillus probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, 82(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00254-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00254-4)
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L., Faccia, M., Giovine, M., & Gobbetti, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from Lactobacillus sanfranciscensis CB1. *International journal of food microbiology*, 87(3), 259-270. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00072-2)
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, 36(8), 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- de Oliveira, G. L. (2018). Probiotic Applications in Autoimmune Diseases. *Probiotics-Current Knowledge and Future Prospects*, 69-89. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73064>
- de Souza, J. V., & Dias, F. S. (2017). Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 13, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.003>
- de Valdez, G. F. (2001). Maintenance of lactic acid bacteria. In *Food Microbiology Protocols* (pp. 163-171). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:163>
- Delgado, A., Brito, D., Fevereiro, P., Tenreiro, R., & Peres, C. (2005). Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *Journal of microbiological methods*, 62(1), 121-124. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.006>
- Dhewa, T., Bajpai, V., Saxena, R. K., Pant, S., & Mishra, V. (2010). Selection of lactobacillus strains as potential probiotics on basis of in vitro attributes. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 5(1), 45.
- Divya, J. B., Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M. (2012). Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(5), 1314-1324. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9561-7>
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 87(1), 21-38. <https://doi.org/10.1051/lait:2006023>
- Doyle, M. P., & Meng, J. I. A. N. G. H. O. N. G. (2006). Bacteria in food and beverage production. *Prokaryotes*. Springer, New York, 797-811. https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9_23

- Duangchitchareon, Y. (2006). *Selection of probiotic lactic acid bacteria from pickles and fermented plant products* (Doctoral dissertation, Chiang Mai: Graduate School, Chiang Mai University).
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., & Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian journal of medical research*, 134(5), 664. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.90992>
- Dubey, A. K., & Jeevaratnam, K. (2015). Probiotic screening of Lactobacilli isolates from Uttapam batter fermented supplementing with Piper betle L. leaves. *Advances in Microbiology*, 5(13), 858. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.513090>
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., ... & Kiely, B. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>
- Durlu-Özkaya, F., Aslim, B., & Ozkaya, M. T. (2007). Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT-Food science and technology*, 40(3), 564-568. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.009>
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 2740. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>
- Essid, I., Ismail, H. B., Ahmed, S. B. H., Ghedamsi, R., & Hassouna, M. (2007). Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat science*, 77(2), 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.003>
- Essid, I., Medini, M., & Hassouna, M. (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat science*, 81(1), 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.020>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2004). EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS : Qualified Presumption of Safety of microorganisms in food and feed. 13-14, Brussels, Belgium.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., & Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT*, 75, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.020>
- Fadda, S., Vignolo, G., & Oliver, G. (2001). Meat protein degradation by tissue and lactic acid bacteria enzymes. In *Food Microbiology Protocols* (pp. 147-162). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:147>

- Feng, G., Guron, G. K., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2009). Characterization of mundticin L, a class IIa anti-Listeria bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Applied and environmental microbiology*, 75(17), 5708-5713. <https://doi.org/10.1128/AEM.00752-09>
- Fleming, H. P., Etchells, J. L., & Costilow, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 30(6), 1040-1042. <https://doi.org/10.1128/AEM.30.6.1040-1042.1975>
- Foligne, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current opinion in microbiology*, 16(3), 284-292. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition*, 109(S2), S35-S50. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004011>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. (2002). *FAO/WHO Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. FAO/WHO, London Ontario, Canada: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*, 151(2), 125-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>
- Franz, C. M., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Galvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews*, 31(3), 293-310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>
- Gaguaoua, M., & Boudechicha, H. R. (2018). Ethnic meat products of the North African and Mediterranean countries: an overview. *Journal of Ethnic Foods*, 5(2), 83-98. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2018.02.004>
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International journal of food microbiology*, 141, S15-S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
- Galvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., & Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current opinion in biotechnology*, 21(2), 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.005>
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology*, 50, S116-S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>

- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: in vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.042>
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in microbiology*, 161(6), 480-487. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>
- Goldman, E., & Green, L. H. (2015). *Practical handbook of microbiology*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/b17871>
- Gou, S., Yang, Z., Liu, T., Wu, H., & Wang, C. (2014). Use of probiotics in the treatment of severe acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical care*, 18(2), R57. <https://doi.org/10.1186/cc13809>
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., ... & De Paula, J. A. (2011). Probiotiques et prébiotiques. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*.
- Guerra, N. P., Bernárdez, P. F., Méndez, J., Cachaldora, P., & Castro, L. P. (2007). Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 134(1-2), 89-107. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.05.010>
- Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S. S., Pal, N. K., & Mandal, S. (2017). Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines*, 5(2), 31. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020031>
- Hanchi, H., Hammami, R., Kourda, R., Hamida, J. B., & Fliss, I. (2014). Bacteriocinogenic properties and in vitro probiotic potential of enterococci from Tunisian dairy products. *Archives of microbiology*, 196(5), 331-344. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0978-y>
- Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013). Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. *Kongo M*, 197-216. <https://doi.org/10.5772/50732>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Calder, P. C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Holland, R., Liu, S. Q., Crow, V. L., Delabre, M. L., Lubbers, M., Bennett, M., & Norris, G. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 711-718. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.012>

- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, 41(2), 85-101. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00044-0)
- Hor, Y. Y., & Liong, M. T. (2014). Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatologica Sinica*, 32(3), 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2014.03.001>
- Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., & Ha, S. D. (2017). Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International*, 100, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.077>
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 730-739. <https://doi.org/10.1128/AEM.02105-06>
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., & Deschamps, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 61(2-3), 193-197. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00366-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00366-4)
- Inturri, R., Stivala, A., Furneri, P. M., & Blandino, G. (2016). Growth and adhesion to HT-29 cells inhibition of Gram-negatives by *Bifidobacterium longum* BB536 e *Lactobacillus rhamnosus* HN001 alone and in combination. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(23), 4943-4949.
- Izuchukwu, N. (2017). Comparative Application of Different Strategies of Bacteriocins Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* MMF-32 for Inhibition of *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 in Cold-Smoked Haddock. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, 38(2), 311-340.
- Johnson M. Statistical Analysis Software Programs in Biomedical Research. *Mater Methods*. 2014 ;4 :1282. <https://doi.org/10.13070/mm.en.4.1282>
- Jonkers, D. M. (2016). Microbial perturbations and modulation in conditions associated with malnutrition and malabsorption. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 30(2), 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.006>
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), 39-48.

- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2013). Probiotics and its functionally valuable products-A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(6), 641-658. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.553752>
- Kaur, S., Kaur, P., & Nagpal, R. (2015). In vitro biosurfactant production and biofilm inhibition by lactic acid bacteria isolated from fermented food products. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 10(1), 17.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11(1), 115-122. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80086-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80086-2)
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Kim, Y., & Kim, S. H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(2), 324-329. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.053>
- KIMOTO, H., NOMURA, M., KOBAYASHI, M., OKAMOTO, T., & OHMOMO, S. (2004). Identification and probiotic characteristics of Lactococcus strains from plant materials. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 38(2), 111-117. <https://doi.org/10.6090/jarq.38.111>
- KOHAJDOVÁ, G. G. A. Š. Z. (2006). In vitro testing of selected probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium longum. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(2), 77-83.
- Kollath, W. (1953). Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 8(11), Suppl-7.
- König, H., & Fröhlich, J. (2017). Lactic acid bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-41). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1
- Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- KUHLMANN, W. D. (2006). Buffer solutions.
- Kumagai, T., Seno, K., Kawamura, H., Watanabe, T., & Okada, S. (2001). Fermentation and growth of plant origin lactic acid bacteria in human diet model medium. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)*. <https://doi.org/10.3136/nskkk.48.677>

- Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., & Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5644-5650. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004>
- Lähäinen, T., Malinen, E., Koort, J. M., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., ... & Palva, A. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. *Anaerobe*, 16(3), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.08.002>
- Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., & Zerrouq, F. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 10(4), 267-277.
- Leahy, J. L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Archives of medical research*, 36(3), 197-209. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.01.003>
- LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V. V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., ... & Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria-current knowledge and potential applications. *Journal of applied microbiology*, 111(6), 1297-1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
- Leite, A. M., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B., & Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of dairy science*, 98(6), 3622-3632. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9265>
- Leveau, J. Y., Boiux, M., & De Roissart, H. B. (1991). La flore lactique: technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires (2nd Edn), Technology & Document, Lavoisier. *Paris*, 3, 2-40.
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
- Liu, C. H., Wu, K., Chu, T. W., & Wu, T. M. (2018). Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture international*, 26(1), 63-74. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0189-z>
- Liu, S. N., Han, Y., & Zhou, Z. J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44(3), 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.034>
- Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., & Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.027>

- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- Martínez-Cuesta, M. C., de Palencia, P. F., Requena, T., & Peláez, C. (2001). Enzymatic ability of Lactobacillus casei subsp. casei IFPL731 for flavour development in cheese. *International Dairy Journal*, 11(8), 577-585. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00046-2)
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International journal of food microbiology*, 105(3), 281-295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science*, 67(1), 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.10.003>
- McIntyre, L., Hudson, J. A., Billington, C., & Withers, H. (2012). Biocontrol of foodborne bacteria. In *Novel technologies in food science* (pp. 183-204). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7880-6_8
- Mechai, A., Debabza, M., & Kirane, D. (2014). Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *International Food Research Journal*, 21(6), 2451.
- Miremedi, F., Ayyash, M., Sherkat, F., & Stojanovska, L. (2014). Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. *Journal of Functional Foods*, 9, 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.002>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Monnet, C., Latriille, E., Béal, C., & Corrieu, G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual review of microbiology*, 3(1), 371-394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Monteagudo-Mera, A., Caro, I., Rodríguez-Aparicio, L. B., Rúa, J., Ferrero, M. A., & García-Armesto, M. R. (2011). Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *Journal of food protection*, 74(8), 1379-1386. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-392>
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R., & Ferrero, M. Á. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 531-541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014>

- Morelli, L., & Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology*, 46, S1-S2. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318269fdd5>
- Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., & Lunina, J. N. (2013). The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(16), 7387-7397. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5054-z>
- Mridula, D., & Sharma, M. (2015). Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 482-487. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.011>
- Mukdsi, M. C. A., Haro, C., González, S. N., & Medina, R. B. (2013). Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 801-809. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.026>
- Mukdsi, M. C. A., Medina, R. B., Alvarez, M. D. F., & González, S. N. (2009). Ester synthesis by lactic acid bacteria isolated from goat's and ewe's milk and cheeses. *Food Chemistry*, 117(2), 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.105>
- Muller, C., Busignies, V., Mazel, V., Forestier, C., Nivoliez, A., & Tchoreloff, P. (2013). Mechanistic approach to stability studies as a tool for the optimization and development of new products based on *L. rhamnosus* Lcr35[®] in compliance with current regulations. *Plos one*, 8(11), e79041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079041>
- Musikasang, H., Sohsomboon, N., Tani, A., & Maneerat, S. (2012). Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probiotic potential from Thai indigenous chickens. *Czech J Anim Sci*, 57(3), 137-149. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0020-8>
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., & Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1337-1345. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0020-8>
- Naidu, K. S. B., Adam, J. K., & Govender, P. (2012). The use of probiotics and safety concerns: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(41), 6871-6877. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1281>
- Naimi, M., & Khaled, M. B. (2014). Isolation and Phenotypic Characterization of *Lactobacillus Sakei* and *Pediococcus* spp. Antagonists from Algerian Meat. *Global journal of science frontier research: C Biological Science*, 14(5), 21-25.
- Naimi, S. (2018). Stabilité gastro-intestinale, activité antimicrobienne et impact sur le microbiote colique de la microcine J25: Approches métagénomiques et métabolomiques.
- Ng, S. Y., Koon, S. S., Padam, B. S., & Chye, F. Y. (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambangan (*Mangifera pajang*). *Cyta-Journal of food*, 13(4), 563-572. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1020342>

- **O**gunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808. <https://doi.org/10.1111/jam.12875>
- Oh, Y. J., & Jung, D. S. (2015). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *LWT-food Science and Technology*, 63(1), 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.005>
- Ooi, L. G., & Liong, M. T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International journal of molecular sciences*, 11(6), 2499-2522. <https://doi.org/10.3390/ijms11062499>
- Oozeer, R., Leplingard, A., Mater, D. D., Mogenet, A., Michelin, R., Seksek, I., ... & Corthier, G. (2006). Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5615-5617. <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-06>
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F., & Ataoglu, H. (2010). Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 2(3), 162-174. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9050-7>
- **P**apadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foliagné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
- Pereira, D. I., & Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4689-4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002>
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495-512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>
- Pinto, M. G. V., Franz, C. M., Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2006). *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International journal of food microbiology*, 109(3), 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029>
- Psani, M., & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1329-1336. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9180-y>
- **Q**uinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.518190>

- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food microbiology*, 36(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.010>
- Rather, I. A., Choi, K. H., Bajpai, V. K., & Park, Y. H. (2015). Antiviral mode of action of *Lactobacillus plantarum* YML009 on Influenza virus H1N1. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(2), 475-482. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i2.23068>
- Reid, G. (2005). The importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Current pharmaceutical design*, 11(1), 11-16. <https://doi.org/10.2174/1381612053382395>
- Reid, G. (2006). FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics.
- Reinberg, E. (2015). Étude in vitro de la stabilité gastro-intestinale et de l'activité biologique de la microcine J25: impact sur l'équilibre du microbiote colique et activité inhibitrice contre *Salmonella enteritidis*.
- Ripert, G., Racedo, S. M., Elie, A. M., Jacquot, C., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2016). Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(6), 3445-3454. <https://doi.org/10.1128/AAC.02815-15>
- Rosenberg, M. (2006). Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS microbiology letters*, 262(2), 129-134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x>
- Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., & Karam, N. E. (2009). Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *Eur. J. Sci. Res*, 34(2), 218-227.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00160-1)
- Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P. S., Fontana, C., Saavedra, L., ... & Hebert, E. M. (2016). Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of applied microbiology*, 120(5), 1289-1301. <https://doi.org/10.1111/jam.13104>
- Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Clara, G. D. L. R., Margolles, A., & Sánchez, B. (2011). How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes & nutrition*, 6(3), 307-318. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0207-5>
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*, 149(1), 88-105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.003>

- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., ... & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British journal of nutrition*, 80(S1), S147-S171. <https://doi.org/10.1079/BJN19980108>
- Salminen, S., Ouwehand, A. C., & Isolauri, E. (1998). Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 563-572. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00077-6)
- Samot, J., & Badet, C. (2013). Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe*, 19, 34-38. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007>
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_2), S58-S61. <https://doi.org/10.1086/523341>
- Sanders, M. E. (2011). Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. *Journal of clinical Gastroenterology*, 45, S115-S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318227414a>
- Sanni, A. I., Morlon-Guyot, J., & Guyot, J. P. (2002). New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International journal of food microbiology*, 72(1-2), 53-62. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00607-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00607-9)
- Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11), 1284-1289. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.016>
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(8), 1901-1906. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.8.1901-1906.1989>
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 361s-364s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>
- Serrano-Nino, J. C., Solis-Pacheco, J. R., & Gutierrez-Padilla, J. A. (2016). Isolation and identification of lactic acid bacteria from human milk with potential probiotic role. *J Food Nutr Res*, 4(3), 170-177. <https://doi.org/10.12691/jfnr-4-3-7>
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of dairy science*, 83(4), 894-907. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74953-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8)
- Shin, M. S., Han, S. K., Ji, A. R., Kim, K. S., & Lee, W. K. (2008). Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *Journal of applied microbiology*, 105(6), 2203-2212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03935.x>

- Soleimani, N. A., Kermanshahi, R. K., Yakhchali, B., & Sattari, T. N. (2010). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research*, 4(20), 2169-2173.
- Spencer, J. F. (2001). *Food microbiology protocols* (Vol. 14). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1385/1592590292>
- Takahashi, N., Xiao, J. Z., Miyaji, K., Yaeshiima, T., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., ... & Hosono, A. (2004). Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *The journal of dairy research*, 71(3), 340. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000251>
- Tambekar, D. H., & Bhutada, S. A. (2010). An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research in Science and Technology*.
- Taranto, M. P., Perez-Martinez, G., & de Valdez, G. F. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology*, 157(8), 720-725. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.04.002>
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., & Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00162-9)
- Thomas, P., Sekhar, A. C., Upreti, R., Mujawar, M. M., & Pasha, S. S. (2015). Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>
- Thongsom, M. (2004). Lactic acid bacteria in digestive tract of black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Master of Science Degree Thesis. Prince of Songkla University*.
- Todorov SD, Furtado DN, Saad SMI, et al. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*. 2011; 110 (4): 971-986.
- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., & Özçelik, F. (2015). In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/315819>
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of dairy science*, 96(7), 4252-4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>

- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., & Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 393s-398s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.393s>
- Urdaci, M. C., Bressollier, P., & Pinchuk, I. (2004). *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *Journal of clinical gastroenterology*, 38, S86-S90. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69>
- Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
- Vera-Pingitore, E., Jimenez, M. E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., ... & Plumed-Ferrer, C. (2016). Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.046>
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International journal of food microbiology*, 96(2), 149-164. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.016>
- Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.012>
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)
- Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., & Reinheimer, J. (2011). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2, 70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00070>
- Wan, L. Y. M., Chen, Z. J., Shah, N. P., & El-Nezami, H. (2016). Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(16), 2628-2641. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.905450>
- Weber, T. K., & Polanco, I. (2012). Gastrointestinal microbiota and some children diseases: a review. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/676585>
- WGO: World Gastroenterology Organisation (2008). WGO World Gastroenterology Organisation Practice Guideline. Probiotics and prebiotics.

- Yacouba, I. (2009). Analyse des techniques traditionnelles de transformation de la viande en Kilichi dans la commune urbaine de Madaoua (Rép. du Niger). *Mémoire d'ingénieur, Institut Polytechnique Rural de Formation et de Recherche Appliquée (IPR/IFRA)*, 200.
- Yerlikaya, O. (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology*, 34(2), 221-229. <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0050>
- Zhang, D., Zhang, S., Guidesi, E., Zonenschain, D., Sagheddu, V., Lee, S., ... & Elli, M. (2018). Isolation and Characterization of New Probiotic Strains From Chinese Babies. *Journal of clinical gastroenterology*, 52, S27-S34. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001113>
- Zhang, Q., Wu, Y., & Fei, X. (2016). Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *International journal of food sciences and nutrition*. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1181156>
- Ziemer, C. J., & Gibson, G. R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 473-479. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00071-5)
- Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2008). *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. *International journal of food microbiology*, 121(1), 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.013>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. J. A. E. M. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1875-1881. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1875-1881.1990>

Chapitre 5

Conclusion, limites et travaux futurs

5.1	Conclusion	172
5.2	Limites de l'étude	173
5.3	Travaux futures	173

5.1 Conclusion

Dans la présente étude, le *Guedid*, un ethnique produit de terroir algérien a fait l'objet d'analyses physicochimiques (l'humidité : 5.94 %, a_w : < 0.87 %, matière sèche : 94.04 %, salinité 1.24 %, et pH : 5.81) et microbiologiques (germes aérobies : $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$, Coliformes : $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18 \cdot 10^3$, *St. aureus* : $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$, bactéries lactiques : $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$, Levures et Moisissures : $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$, $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$, Coliformes fécaux, bactéries sulfito-réductrices et de Salmonelles (< de 10 UFC / g). Analyses réalisées conformément aux normes en guise d'exploiter les teneurs trouvées pour une éventuelle élaboration de standards nationaux du produit. L'étude de l'effet antibactérien de (157) isolats lactiques autochtones a pu élire trente (30) candidats appartenant phénitiquement aux genres : *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Weisella* et *Tetragenococcus* actifs contre des pathogènes cibles à impact sanitaire particulièrement *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923 et *L. ivanovii* ATCC 19119. Cet examen carrefour de sélection probiotique et technologique a permis de découvrir un intéressant potentiel des isolats candidats après avoir rempli les différentes exigences et recommandations du comité mixte de la FAO/OMS et de l'EFSA, et être ainsi doués d'une capacité protectrice qui peut contribuer à l'amélioration de la stabilité, la sécurité, ainsi que la qualité sensorielle des produits alimentaires. Le potentiel probiotique de ces candidats et leur aspect autochtone représentent deux prérogatives pouvant les rendre des concurrents plus efficaces aux cultures probiotiques commercialisées, en particulier *Enterococcus sp.* Lbm49, *Aerococcus sp.* Lbm19, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46, *Aerococcus sp.* Lbm3 et *Enterococcus sp.* Lbm50 qui présentaient le score probiotique le plus élevé et *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46 et *Enterococcus sp.* Lbm49 qui possédaient de souhaitables performances technologiques. Vraisemblablement, ces dernières souches pourraient aussi être des promoteurs pour la fabrication des produits « bio » de haute qualité et sécurité, notamment en faveur des unités de production startups n'ayant pas accès à la grande industrie, dans l'espoir d'épanouir l'économie locale et nationale.

5.2 Limites de l'étude

Une des limites majeures est le manque de moyens d'identification biochimique (galerie miniaturisée API50 CH) et moléculaire (*MALDI-TOF MS*, PCR amplification et séquençage de ARNr 16S), ainsi le défaut de lyophilisation afin de maintenir à long terme les candidats d'intérêt. S'ajoute à cela, à côté de l'évaluation probiotique le manque du matériels et de produits pour la mise en évidence de la résistance aux spermicides, la détermination du taux d'assimilation du cholestérol à l'aide de la méthode o-phthalaldéhyde et la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales humaines Caco-2.

5.3 Travaux futures

Des essais supplémentaires demeurent nécessaires pour comprendre de manière approfondie et prédire les fonctions probiotiques en *ex vivo* sur un modèle animal, suivi par d'autres essais cliniques et toxicologiques pour confirmer leur utilisation humaine et/ou vétérinaire. Mais a priori, une évaluation d'autres propriétés biologiques à savoir l'activité anti-obésité et anti-diabétiques. D'ailleurs, le souci vient d'inciter trois analyses systématiques et statistiques (méta-analyses) combinant les données de plusieurs ECR sur ; (1) le microbiote intestinal, le diabète de type 2 et l'obésité ; (2) les probiotiques et le contrôle de la glycémie et (3) les probiotiques, et la prévention et le traitement des infections respiratoires virales, tel le cas du COVID-19. Ceci afin de connaître les souches probiotiques les plus utilisées dans ce sens, leurs doses, l'approche et la durée du traitement, l'efficacité et les marqueurs biochimiques cliniques à doser.

Table des Matières

Avant-propos	I
ملخص	II
Résumé	III
Abstract	IV
Liste des tableaux	V
Liste des figures	VI
Liste des abréviations	VII
	IX

Chapitre 1

Introduction générale

1.1	Contexte	2
1.2	Lieu de l'étude	3
1.3	Objectifs de l'étude	3
1.4	Valorisation de l'étude	4
1.5	Organisation du manuscrit	5

Chapitre 2

Analyses physicochimiques et microbiologiques du microenvironnement de *Guedid*

2.1	Résumé	7
2.2	Introduction	8
2.3	Matériel et méthodes	11
2.3.1	Matériel de paillasse et produits de laboratoire	11
2.3.2	Échantillonnage et préparation en vue d'analyses	12
2.3.3	Prises d'essai, dilutions mères et décimales	13
2.3.4	Recherche et dénombrement des germes aérobies	13
2.3.5	Recherche et dénombrement des Coliformes et Coliformes fécaux	13

2.3.6	Recherche et dénombrement des Staphylocoques (<i>St. aureus</i> et autres espèces)	14
2.3.7	Recherche et dénombrement des bactéries lactiques	14
2.3.8	Recherche et dénombrement des bactéries sulfito-réductrices	14
2.3.9	Recherche et dénombrement des <i>Salmonelles</i>	15
2.3.10	Recherche et dénombrement des Levures et de Moisissures	15
2.3.11	Déterminations physicochimiques	15
a.	Humidité et matière Sèche	15
b.	Salinité et pH	16
c.	Activité de l'eau (a_w)	16
2.4	Résultats	16
2.4.1	Résultats de déterminations microbiologiques	16
2.4.2	Résultats de déterminations physicochimiques	20
2.5	Discussion	22
2.6	Conclusion	26
2.7	Références bibliographiques	27

Chapitre 3

Recherche de l'activité antibactérienne et identification phénétique du microbiote lactiques de *Guedid*

3.1	Résumé	36
3.2	Introduction	37
3.3	Matériel et méthodes	54
3.1.1	Matériel de paillasse et produits de laboratoire	54
3.1.2	Isolement et tests d'orientation	56
a.	Coloration de gram	56
b.	Test de catalase	57
c.	Test de sporulation	57
d.	Maintien à court terme	57
3.1.3	Test de screening	57
a.	Matériel bactérien	57
b.	Test de spots sur gélose	58
c.	Test de diffusion en puits sur gélose	59
d.	Exclusion de l'inhibition par acidité	59
e.	Analyse des résultats	60
3.1.4	Identification phénétique	60
a.	Croissance à différentes températures	60
b.	Croissance à différentes concentrations en NaCl	60
c.	Croissance à différentes valeurs de pH	60
d.	Production de CO ₂ à partir du glucose	61
e.	Arginine Di-Hydrolase (ADH)	61
f.	Uréase	61
g.	Hydrogène sulfuré (H ₂ S) et mobilité	61
h.	Nitrate réductase	62

i.	Assimilation des sucres	62
j.	Analyse des résultats et regroupement des isolats lactiques	62
k.	Martien à long terme	62
3.4	Résultats	63
3.4.1	Résultats de l'isolement et tests d'orientation	63
3.4.2	Résultats des tests de screening	63
3.4.3	Résultats de l'identification phénétique	69
3.5	Discussion	76
3.6	Conclusion	84
3.7	Références bibliographiques	85

Chapitre 4

Evaluation probiotique des genres lactiques *Aerococcus spp.*, *Enterococcus spp.* et *Weisella sp.* de *Guedid*

4.1	Résumé	100
4.2	Introduction	101
4.3	Matériel et méthodes	120
4.3.1	Matériel de paillasse et produits de laboratoire	120
4.3.2	Matériel bactérien	121
4.3.3	Suivi de croissance et activité antimicrobienne	121
a.	Suivi cinétique de croissance et d'acidité	121
b.	Suivi de production de l'agent inhibiteur	122
c.	Sensibilités, lysogénie et quantification des bactériocines	122
d.	Analyse des résultats	123
4.3.4	Caractérisation des propriétés technologiques	124
a.	Thermorésistance	124
b.	Pouvoirs lipolytique, protéolytique et amylolytique	124
c.	Production des exopolysaccharides et d'acétoïne	124
4.3.5	Caractérisation des propriétés fonctionnelles	125
a.	Tolérance à l'acidité	125
b.	Tolérance aux conditions gastriques et intestinales simulées	125
c.	Réduction du cholestérol	126
d.	Auto-agrégation, co-agrégation et hydrophobicité	126
4.3.6	Caractérisation des propriétés sécuritaires	128
a.	Hémolyse et gélatinase	128
b.	Hydrolase des sels biliaires (SBH)	128
c.	Susceptibilité aux antibiotiques	129
4.3.7	Analyse des résultats	129
4.4	Résultats	130
4.4.1	Caractérisation de l'activité antimicrobienne	130
4.4.2	Caractérisation des propriétés technologiques	134
4.4.3	Caractérisation des propriétés fonctionnelles	136
4.4.4	Caractérisation des propriétés sécuritaires	138
4.4.5	Potentiel technologique et probiotique cumulé	139
4.5	Discussion	134

4.6	Conclusion	153
4.7	Références bibliographiques	153

Chapitre 5

Conclusion, limitations et travaux futurs

5.1	Conclusion	172
5.2	Limitations	173
5.3	Futures travaux	173

Résumé

Le risque combiné de substances chimiques et de microorganismes pathogènes justifie la demande émergente du consommateur pour des aliments fonctionnels « bio » qui, au-delà de l'apport nutritionnel, sont capables d'améliorer la santé. L'objectif principal de la présente thèse était d'étudier le *Guedid*, un produit de terroir traditionnel, par des déterminations physicochimiques et microbiologiques suivies d'une identification phénétique et évaluation probiotique de son microbiote lactique. Dans la première partie de l'étude, les charges moyennes en UFC/g d'échantillon de départ étaient respectivement : $6.07 \cdot 10^4 \pm 1.15 \cdot 10^5$, $1.56 \cdot 10^3 \pm 3.18 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3 \pm 5.99 \cdot 10^3$, $9.75 \cdot 10^3 \pm 1.36 \cdot 10^4$, $8.96 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^5$ et $6.7 \cdot 10^2 \pm 2.4 \cdot 10^3$ pour les germes aérobies, les Coliformes, *St. aureus*, les bactéries lactiques, les Levures et Moisissures. Une absence de Coliformes fécaux, de bactéries sulfito-réductrices et de Salmonelles a été notée (< 10 UFC/g). Pour ce qui est de l'humidité et de la matière sèche, ainsi que la salinité et le pH, et l' a_w les valeurs étaient respectivement estimées à : 5.94 % et 94.04 %, 1.24 % et 5.81, et < 0.87 % respectivement. L'absence de normes et/ou de standards de qualité permet d'attribuer à ces résultats une grande importance informative pour ce produit de terroir considéré comme « bio ». Dans la deuxième partie, le microbiote lactique a exhibé une inhibition de l'ordre de 10 à 30 mm envers les pathogènes : *B. cereus* ATCC 11778, *St. aureus* ATCC 25923, *En. faecalis* ATCC 29212, *L. ivanovii* ATCC 19119, et *Cl. perfringens* CECT 486. Pour l'identification phénétique, l'approche numérique a permis de proposer les genres les plus appropriés : *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* et *Tetragenococcus* avec des IDs et des tests de probabilité bons à excellents. Dans la troisième partie, l'évaluation probiotique *in vitro* a élu les candidats ; *Enterococcus sp.* Lbm49, *Aerococcus sp.* Lbm19, *Aerococcus sp.* Lbm18, *Enterococcus sp.* Lbm46 et *Aerococcus sp.* Lbm3 pour prometteurs en matière du potentiel probiotique (> 55 %) : un pic antagoniste et un pH 3.5 à la phase stationnaire, surnageants sensibles à la chaleur, à la pepsine et l' α -chymotrypsine, isolats thermosensibles à 60 °C/30min, capacité de digestion des protéines, production des EPS et d'acétoïne davantage, viabilité réduite de 1 à 2 unités log aux pH 2, pH 3 et aux conditions gastro-intestinales, assimilation du cholestérol atteignant les 89 %, absence de gélatinase, d'hémolysines et d'hydrolase des sels biliaires, sensibles aux antibiotiques hormis la vancomycine et le sulfaprim avec des coefficients de 0.72 à 0.90. En conclusion, l'étude a permis de constituer une souchothèque d'au moins trente (30) bactéries lactiques probiotiques à propriétés protectrices, technologiques et fonctionnelles intéressantes et pouvant servir de bio compléments alimentaires ou médicaux surtout pour l'industrie locale startup, ceci afin de répondre aux besoins du consommateur. Toutefois, des études complémentaires restent nécessaires notamment pour une caractérisation moléculaire des isolats élus et une confirmation des résultats par des tests *ex vivo* et *in vivo*.

Mots clés : *Guedid*, probiotique, bactéries lactiques, criblage, identification.